



**Facultad de Ciencias  
Departamento de Biología Molecular**

**TESIS DOCTORAL**

---

**Caracterización de un modelo murino de taupatía tau-P301S  
Alteraciones en el sistema nervioso periférico y central**

**Jesús Merchán Rubira**

Madrid, 2019

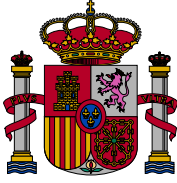
Memoria de investigación presentada por  
**Jesús Merchán Rubira**  
Para optar al grado de  
**Doctor**  
por la **Universidad Autónoma de Madrid**  
dentro del Programa de Doctorado en Biociencias Moleculares

Trabajo dirigido por  
**Dr. Félix Hernández Pérez**  
Profesor Titular del Departamento de Biología Molecular de la  
Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid

y  
**Dr. Jesús Ávila de Grado**  
Profesor de Investigación del  
Consejo Superior de Investigaciones Científicas

La presente tesis ha sido realizada en el  
Centro de Biología Molecular Severo Ochoa  
(CSIC-UAM)





Madrid, 21 de octubre de 2019

**Jesús Ávila de Grado, Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, y Félix Hernández Pérez, Profesor Titular de la Universidad Autónoma de Madrid**

**Informan**

Que la presente tesis doctoral, titulada «Caracterización de un modelo murino de taupatía tau-P301S. Alteraciones en el sistema nervioso periférico y central», ha sido realizada bajo nuestra dirección por D. Jesús Merchán Rubira. Consideramos que el trabajo reviste las características de originalidad y calidad científica requeridas para ser defendida como Tesis Doctoral para optar al grado de Doctor.

Los directores de la tesis,

Dr. Félix Hernández Pérez

Dr. Jesús Ávila de Grado

*A mis padres*



*I do not know what I may appear to the world, but to myself  
I seem to have been only like a boy playing on the seashore,  
and diverting myself in now and then finding a smoother  
pebble or a prettier shell than ordinary, whilst the great  
ocean of truth lay all undiscovered before me*

Isaac Newton

## Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría agradecer a La Caixa la financiación de mi doctorado, y a mis directores de tesis, Félix y Jesús, la oportunidad que me han ofrecido de trabajar con ellos todos estos años en el laboratorio 208.

Del 200-gocho quiero recordar también a muchas personas (y espero no dejarme a nadie) con las que he podido compartir al menos algún tiempo de los casi cinco años de doctorado, y algún año más antes de esto, yendo de aquí para allá; muchos ya no están, otros aún quedan. Jero, una gran persona siempre dispuesta a ayudar, ya sea pinchando un ratón, haciendo una coña o una paella (y lo hace todo bien); Alberto, el vasco, otro gran tío a pesar de esa ojeriza injustificada contra los músicos mas grandes del siglo xx; Almu, con su cajón del hámster y su buen gusto musical (toma nota, Alberto); Patri, con sus probetas de litro de los viernes por la tarde; Juan, la prueba de que se puede llegar muy lejos siendo una buena persona, que al final es lo que importa; Raquel, por ejercer de madre adoptiva, por esas charlas en su despacho, y por su buena mano con el microscopio electrónico, con los geles o con lo que se tercie; Esther, que también me ha ayudado mucho con los experimentos; Nuria, con las comidas abajo, sus dotes adivinatorias y sus pequeñas maldades; Vega, por ser tan maja y por las historias que me cuentas de Iria, que me encantan; Elenita, la que me acogió como alumno panoli cuando aterricé allí por primera vez; Alberto, el que no es «nuestro Alberto», por esas conversaciones intelectuales de raritos que nos han permitido mantener viva la llama de la inteligencia en tiempos difíciles. Al resto de personas que me he ido encontrando en el labo: Pablo, Noe, Diana, Elenas varias, Miguel, Dani, Julia, Laura, Mar, Eugenio. . .

También me gustaría recordar a la gente de Irlanda, por la fantástica experiencia que viví en el RCSI de Dublín: Aidan, Jimmy, Antonella, Aasia, Ed, Luiz, Mariana, Mayara, Fernanda y Tobias, entre otros. A la gente del 206: Mario, M.<sup>a</sup> José; Miri, la chica más fuerte del mundo, a la que admiro por el giro que ha dado a su vida; y sobre todo a Irene, una gran amiga con la que he podido compartir buenos y malos momentos, y con la que espero seguir compartiéndolos muchos años. Ah, e Irene siempre me recuerda a los matemáticos, con los que he disfrutado mucho a pesar de algún incidente con moscatel. A la gente del 209, empezando por Lucas, que nos ha cedido su fantástico microscopio siempre que lo hemos necesitado; también a los que han ido pasando por su labo que he podido conocer y a los que todavía están: Marta, María, Míriam, Ivó, Parras, Ainara, Sara e Ivana. A la gente del animalario, especialmente a José, con una amabilidad que escasea (creo que nunca lo he visto sin una sonrisa), a M.<sup>a</sup> Eugenia, con su empatía por los ratoncitos, a Nacho y a Julia. A María y Juan, del CNB; a Álvaro, de la Complutense, donde hemos sufrido juntos horas interminables de Gran Hermano murino. A la gente de Microscopía Electrónica —Maite, Milagros y Tamara— y a la gente de SMOC —Carlos, Vero, Carmen, Maite, Ángeles, Alfonsa

y Alejandro—, porque han sido geniales en sus enseñanzas, su ayuda y su amabilidad, y a los que debo buena parte de los resultados y fotografías de esta tesis.

Le quiero agradecer a todos mis profesores, desde preescolar hasta ahora, su labor empujándome para llegar a donde he llegado hoy. Miguel Ángel con su mundo en color y su parábola del mono y el plátano, Arturo con su *sapere aude*, Manolo el de Filosofía, Jesús enseñándonos Historia del Arte, Pedro el de Biología, Jesús Page y el afecto que inspira en sus clases, Vicente Mazimpaka apasionado por los musgos, Alberto Suárez enseñándome a programar en Pascal y C... Pablo Fernández Gallardo, esa maravilla de profesor con el que comprendías en dos horas los viernes toda una semana de álgebra y análisis, que emana entusiasmo por entender y por enseñar, y que te puede explicar absolutamente todo con las manos... Y a todos aquellos profesores que puede que haya olvidado, pero que seguro que me dejaron una semilla aquí dentro que ha ido germinando.

A Guadalupe, Diana y Héctor les estaré eternamente agradecido por enseñarme a disfrutar un poco más de mi locura.

Al Compañero, por escuchar, por mamonear, por generar situaciones embarazosas, por abrazar, por mandarme sus novelas aunque no las lea, por ser un gran amigo que me quiere como soy.

A la yaya, por sus tortillas de patata.

A Insecto. Llevas casi toda mi vida aquí (yo llevo toda tu vida aquí, chincha) y, según pasa el tiempo, me voy dando cuenta del valor que tiene nuestra relación, y de cuánta razón tenían tus padres cuando nos decían que nos teníamos el uno al otro para toda la vida. Me alegro mucho de tener ese apoyo en ti, hermanni. Y también de que me ayudaras a pasar la bibliografía a L<sup>A</sup>T<sub>E</sub>X, por cierto.

A mis dos niñas, Raquel y Aitana. Llevo casi 19 años con una y casi 19 meses con la otra, y son el regalo más maravilloso que me ha podido dar la vida. Mi pequeña familia, gracias por existir y por hacerme tan feliz.

Y, por último, quiero dedicarles esta tesis a mis padres. Lo que me habéis dado, y lo que me seguís dando cada día, es imposible de devolver. Todo lo que soy y todo lo que he conseguido os lo debo a vosotros, a vuestro apoyo incondicional, a vuestro cariño, a vuestros abrazos, a vuestro tiempo. Como no os puedo devolver algo así, intentaré transmitirlo a Aitana le mejor que sepa. Os quiero mucho, papis.

## Índice

<b>Nomenclatura</b> . . . . .	<b>V</b>
<b>Resumen</b> . . . . .	<b>IX</b>
<b>Abstract</b> . . . . .	<b>X</b>
<b>1 Introducción</b> . . . . .	<b>1</b>
1.1 Enfermedad de Alzheimer . . . . .	1
1.2 La proteína tau y las taupatías . . . . .	4
1.3 Proteína tau extracelular . . . . .	9
1.4 Modelos animales de taupatías . . . . .	11
1.5 Proteína tau y neurogénesis adulta . . . . .	15
1.6 Fosfatasa alcalina no específica de tejido . . . . .	19
<b>2 Objetivos</b> . . . . .	<b>21</b>
<b>3 Materiales y métodos</b> . . . . .	<b>23</b>
3.1 Animales . . . . .	23
3.2 Genotipado por PCR . . . . .	23
3.3 Inyección estereotáxica de retrovirus . . . . .	24
3.4 Pruebas de comportamiento . . . . .	26
3.4.1 Rotarod . . . . .	26
3.4.2 Campo abierto y preferencia de nueva posición . . . . .	26
3.4.3 Laberinto acuático de Morris . . . . .	27
3.5 Sacrificio y preparación inicial de muestras . . . . .	27
3.6 <i>Western blot</i> . . . . .	28
3.7 Proteómica . . . . .	29
3.8 Técnicas histológicas . . . . .	29
3.8.1 Inmunofluorescencia . . . . .	29
3.8.2 Inmunohistoquímica . . . . .	30
3.8.3 Microscopía electrónica . . . . .	30
3.9 Cuantificaciones histológicas . . . . .	30
3.10 Análisis estadístico . . . . .	32
3.11 Software . . . . .	33
3.12 Reactivos comunes y anticuerpos . . . . .	33

<b>4 Resultados</b>	<b>35</b>
4.1 Expresión del transgén en el ratón P301S	35
4.1.1 Sobreexpresión e hiperfosforilación de tau-P301S en el CNS	35
4.1.2 Sitios de fosforilación de tau-P301S en el CNS	37
4.1.3 Sobreexpresión e hiperfosforilación de tau-P301S en el PNS	37
4.2 Neurodegeneración en el ratón P301S	39
4.2.1 Fenotipo motor de parálisis y atrofia con supervivencia reducida	39
4.2.2 Atrofia hipocampal a los 11 meses, pero no con 2,5 meses	40
4.2.3 Muerte celular aumentada en el hipocampo	40
4.3 Pruebas comportamentales en el ratón P301S	41
4.3.1 Comportamiento hiperactivo y de baja ansiedad en la prueba OF	43
4.3.2 Sin diferencias significativas en la prueba MWM	44
4.3.3 Hiperactividad sin diferencias de reconocimiento en la prueba NLP	45
4.4 Neurogénesis adulta en el ratón P301S	46
4.4.1 Expresión tardía del transgén tau-P301S en la neurogénesis adulta	47
4.4.2 Aumento de células DCX <sup>+</sup> en la neurogénesis adulta	49
4.4.3 Aumento de células Calr <sup>+</sup> en la neurogénesis adulta	49
4.4.4 Sin diferencias significativas en la morfología dendrítica	50
4.5 Estudio de los modelos P301S y Akp2	52
4.5.1 Sobreexpresión e hiperfosforilación de tau en P301S y Akp2/P301S	52
4.5.2 Astrogliosis en P301S y Akp2/P301S	52
4.5.3 Microgliosis en P301S y Akp2/P301S	53
4.5.4 Atrofia hipocampal en P301S y Akp2/P301S	54
4.5.5 Aumento de células DCX <sup>+</sup> en P301S y Akp2/P301S	56
4.5.6 Correlaciones entre variables de neurodegeneración y neurogénesis	56
4.5.7 Akp2/P301S revierte los daños del nervio ciático de P301S	59
4.5.8 Akp2/P301S revierte las alteraciones motoras de P301S	61
<b>5 Discusión</b>	<b>65</b>
5.1 Sobreexpresión de tau y neurodegeneración en el CNS del ratón P301S	66
5.2 Sobreexpresión de tau y neurodegeneración en el PNS del ratón P301S	67
5.3 Pruebas comportamentales en el ratón P301S	70
5.4 Neurogénesis adulta en el ratón P301S	71
5.5 El ratón Akp2/P301S como modelo genético terapéutico	74
<b>6 Conclusiones</b>	<b>79</b>
<b>Referencias</b>	<b>81</b>

## Índice de tablas

3-1	Oligonucleótidos y PCR para el genotipado . . . . .	24
3-2	Anticuerpos primarios empleados . . . . .	34

## Índice de figuras

1-1	Enfermedad de Alzheimer: marcas histopatológicas y principales hipótesis . .	3
1-2	Principales isoformas de tau en el humano adulto . . . . .	5
1-3	Etapas y marcadores en la neurogénesis hipocampal adulta . . . . .	18
4-1	Sobreexpresión e hiperfosforilación de tau en el CNS del ratón P301S (IF) .	36
4-2	Sobreexpresión e hiperfosforilación de tau en el CNS del ratón P301S (WB) .	37
4-3	Sobreexpresión e hiperfosforilación de tau en el PNS del ratón P301S . . . .	38
4-4	Fenotipo motor y supervivencia reducida en el ratón P301S . . . . .	40
4-5	Atrofia hipocampal en el ratón P301S . . . . .	41
4-6	Muerte celular en el hipocampo dorsal del ratón P301S . . . . .	42
4-7	Hiperactividad y baja ansiedad en la prueba OF del ratón P301S . . . . .	44
4-8	Prueba del laberinto acuático de Morris sin diferencias en el ratón P301S . .	44
4-9	Hiperactividad sin déficits de reconocimiento en la prueba NLP del P301S .	45
4-10	Expresión tardía del transgén en la neurogénesis adulta del ratón P301S . . .	48
4-11	Aumento de células DCX <sup>+</sup> en el hipocampo dorsal del ratón P301S . . . . .	49
4-12	Aumento de células Calr <sup>+</sup> en el hipocampo dorsal del ratón P301S . . . . .	50
4-13	Morfología dendrítica sin diferencias en la neurogénesis adulta del P301S . .	51
4-14	P-tau en el hipocampo dorsal de los genotipos P301S y Akp2/P301S . . . . .	53
4-15	Astroglisis en el hipocampo dorsal de los genotipos P301S y Akp2/P301S .	54
4-16	Microglisis en el hipocampo dorsal de los genotipos P301S y Akp2/P301S .	55
4-17	Atrofia en el hipocampo dorsal de los genotipos P301S y Akp2/P301S . . . .	56
4-18	Aumento de células DCX <sup>+</sup> en los genotipos P301S y Akp2/P301S . . . . .	57
4-19	Correlaciones de P-tau con astroglisis, microglisis, volumen y DCX . . . .	58
4-20	El genotipo Akp2/P301S revierte los daños del nervio ciático del P301S . . .	60
4-21	El genotipo Akp2/P301S revierte las alteraciones motoras del P301S . . . .	62

## Nomenclatura

aa	<i>Amino acids</i> / aminoácidos
AD	<i>Alzheimer's disease</i> / enfermedad de Alzheimer
<i>Akp2</i>	<i>Alkaline phosphatase, liver/bone/kidney (murine gene)</i> / fosfatasa alcalina, hígado/hueso/riñón (gen murino)
<i>ALPL</i>	<i>Alkaline phosphatase, liver/bone/kidney (human gene)</i> / fosfatasa alcalina, hígado/hueso/riñón (gen humano)
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> / análisis de la varianza
AP	<i>Alkaline phosphatase</i> / fosfatasa alcalina
APP	<i>Amyloid precursor protein</i> / proteína precursora amiloidea
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i> / trifosfato de adenosina
A $\beta$	<i>Amyloid-<math>\beta</math></i> / $\beta$ -amiloide
BLBP	<i>Brain lipid-binding protein</i> / proteína de unión a lípidos del cerebro
bp	<i>Base pair</i> / par de bases
BrdU	<i>5-bromo-2'-deoxyuridine</i> / 5-bromo-2'-desoxiuridina
C-Casp-3	<i>Cleaved caspase-3</i> / caspasa-3 cortada
CA	<i>Cornu ammonis</i>
Calb	<i>Calbindin</i> / calbindina
Calr	<i>Calretinin</i> / calretinina
Casp-3	<i>Caspase-3</i> / caspasa-3
CBMSO	Centro de Biología Molecular Severo Ochoa
CDK	<i>Cyclin-dependent kinase</i> / quinasa dependiente de ciclina
cDNA	<i>Complementary DNA</i> / DNA complementario
CldU	<i>5-chloro-2'-deoxyuridine</i> / 5-cloro-2'-desoxiuridina
CNS	<i>Central nervous system</i> / sistema nervioso central
DAB	<i>3,3'-diaminobenzidine</i> / 3,3'-diaminobencidina
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i> / 4',6-diamino-2-fenilindol
DCX	<i>Doublecortin</i> / doblecortina
DG	<i>Dentate gyrus</i> / giro dentado

---

DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> / ácido desoxirribonucleico
dNTP	<i>Deoxyribonucleotide triphosphate</i> / trifosfato de desoxirribonucleótido
DOI	<i>Digital object identifier</i> / identificador de objeto digital
EC	<i>Enzyme Commission (nomenclature)</i> / comisión enzimática (nomenclatura)
FAD	<i>Familial Alzheimer's disease</i> / enfermedad de Alzheimer familiar
FTDP-17	<i>Frontotemporal dementia with parkinsonism linked to chromosome 17</i> / demencia frontotemporal con parkinsonismo ligada al cromosoma 17
GABA	<i>γ-aminobutyric acid</i> / ácido γ-aminobutírico
GAPDH	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i> / deshidrogenasa de gliceraldehído-3-fosfato
GCL	<i>Granule-cell layer</i> / capa de células granulares
GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i> / proteína ácida fibrilar glial
GFP	<i>Green fluorescent protein</i> / proteína fluorescente verde
GSK-3β	<i>Glycogen-synthase kinase-3β</i> / quinasa 3β de la sintasa de glucógeno
GWAS	<i>Genome-wide association study</i> / estudio de asociación del genoma completo
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> / peroxidasa de rábano
Iba1	<i>Ionized calcium-binding adapter molecule 1</i> / molécula adaptadora de unión a calcio ionizado 1
IdU	<i>5-iodo-2'-deoxyuridine</i> / 5-yodo-2'-desoxiuridina
IF	<i>Immunofluorescence</i> / inmunofluorescencia
IH	<i>Immunohistochemistry</i> / inmunohistoquímica
KO	<i>Knockout</i>
LTD	<i>Long-term depression</i> / depresión a largo plazo
LTP	<i>Long-term potentiation</i> / potenciación a largo plazo
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i> / quinasa de proteínas activada por mitógenos
<i>MAPT</i>	<i>Microtubule-associated protein tau (human gene)</i> / proteína tau asociada a microtúbulos (gen humano)
MWM	<i>Morris water maze</i> / laberinto acuático de Morris
NeuN	<i>Neuronal nuclei (protein)</i> / núcleos neuronales (proteína)
NFT	<i>Neurofibrillary tangles</i> / ovillos neurofibrilares



NLP	<i>Novel-location preference</i> / preferencia de nueva posición
OF	<i>Open field</i> / campo abierto
P-tau	<i>Phospho-tau</i> / fosfo-tau
PB	<i>Phosphate buffer</i> / tampón fosfato
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> / tampón fosfato salino
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> / reacción en cadena de la polimerasa
PDF	<i>Portable document format</i> / formato de documento portátil
PFA	<i>Paraformaldehyde</i> / paraformaldehído
PFU	<i>Plaque-forming unit</i> / unidad formadora de placa
<i>PGRN</i>	<i>Progranulin (human gene)</i> / progranulina (gen humano)
PH3	<i>Phospho-histone H3</i> / fosfo-histona H3
PHF	<i>Paired helical filaments</i> / filamentos helicoidales apareados
PNS	<i>Peripheral nervous system</i> / sistema nervioso periférico
PP	<i>Protein phosphatase</i> / fosfatasa de proteínas
<i>Prnp</i>	<i>Prion protein (murine gene)</i> / proteína priónica (gen murino)
PS	<i>Presenilin</i> / presenilina
PSD95	<i>Postsynaptic-density protein 95</i> / proteína 95 de la densidad postsináptica
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> / ácido ribonucleico
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis</i> / electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SEM	<i>Standard error of the mean</i> / error estándar de la media
SGZ	<i>Subgranular zone</i> / zona subgranular
SOX2	<i>SRY (sex-determining region Y)-box 2</i> / SRY (región Y determinante del sexo)-caja 2
TNAP	<i>Tissue-nonspecific alkaline phosphatase</i> / fosfatasa alcalina no específica de tejido
URL	<i>Uniform resource locator</i> / localizador uniforme de recursos
WB	<i>Western blot</i>
WT	<i>Wild type</i> / tipo silvestre

## Resumen

Los ratones transgénicos que incluyen el gen *MAPT* humano con algunas de las mutaciones características de la FTDP-17 (demencia frontotemporal con parkinsonismo ligada al cromosoma 17) son frecuentemente empleados como modelo no solo de esta taupatía sino también de otras como la enfermedad de Alzheimer (AD). Aquellos modelos que incluyen mutaciones en el residuo 301 (prolina) están entre los más utilizados por su buena aproximación histopatológica a los efectos de la disfunción asociada a tau en pacientes de AD; en la presente tesis nos centramos en un modelo tau-P301S denominado PS19.

Teniendo en cuenta la relación entre tau y la neurogénesis adulta hipocampal, y la ausencia de literatura al respecto en modelos tau-P301S, el estudio de este proceso centró una de las partes de nuestro trabajo. Además de una caracterización de la neurodegeneración en el sistema nervioso central (CNS) de este ratón, quisimos también estudiar el sistema nervioso periférico (PNS), mucho menos tratado en la bibliografía y especialmente interesante a la luz del fuerte fenotipo motor que nuestro modelo P301S desarrolla. La última parte fue dedicada al modelo doble *Akp2/P301S*, que combina el transgén tau-P301S con una haploinsuficiencia para la fosfatasa alcalina no dependiente de tejido (TNAP), que tiene actividad fosfatasa sobre tau. Teniendo en cuenta que la proteína tau desfosforilada por esta exoenzima puede desencadenar la apoptosis de neuronas vecinas, nuestro objetivo fue determinar si una menor carga de TNAP podría conllevar un amortiguamiento de este efecto neurotóxico y, por lo tanto, una ralentización o interferencia en la progresión de los daños neurodegenerativos.

En nuestro modelo P301S observamos una reducción drástica de la supervivencia (hasta una mediana de 11,7 meses) debida a un fenotipo de parálisis motora que suele debutar a partir de los 9 meses. A esta edad, el ratón presenta una sobreexpresión y una hiperfosforilación de la proteína tau transgénica tanto en el hipocampo como en el nervio ciático, atrofia hipocampal acompañada de muerte celular aumentada, gliosis reactiva, y degeneración axonal en el nervio ciático acompañada de los problemas motores evidenciados en la prueba del rotarod; los ratones también mostraron hiperactividad, y no se encontraron diferencias con respecto a los controles a nivel de memoria y navegación espacial dependientes del hipocampo. Se detectó una neurogénesis adulta aumentada, sin diferencias con respecto a los controles en la morfología dendrítica, que podría actuar como mecanismo compensatorio que justificara el mantenimiento de la función hipocampal a pesar de la neurodegeneración observada; el inicio de la expresión del transgén fue observado en etapas tardías de la neurogénesis.

El ratón *Akp2/P301S* mostró los mismos marcadores de neurodegeneración en el CNS que el modelo P301S, así como la neurogénesis aumentada, pero esto no sucedió a nivel del PNS: se observó una recuperación a valores del grupo control de la degeneración axonal en el nervio ciático, así como del rendimiento motor. Estos resultados refuerzan la hipótesis de la ralentización en el avance de la patología, y deberían tenerse en cuenta para explorar la posible utilidad terapéutica de inhibidores de la TNAP.

## Abstract

Transgenic mice harbouring human *MAPT* gene with characteristic FTDP-17 (fronto-temporal dementia with parkinsonism linked to chromosome 17) mutations are frequently used as models not only of this tauopathy but also of other tauopathies as Alzheimer's disease (AD). Those models including mutations in residue 301 (proline) are amongst the most employed ones due to their histopathological similarity to the effects associated with tau-related dysfunction in AD patients; in this thesis we will focus on a P301S-tau model named PS19.

Given the connection between tau and adult hippocampal neurogenesis, and the absence of literature on that subject in P301S-tau models, the study of this process was one of the topics of our work. Besides a characterization of the neurodegeneration of the central nervous system (CNS) in this mouse, we also aimed at the peripheral nervous system (PNS), less frequently addressed in the bibliography and especially interesting in light of the strong motor phenotype that our P301S model develops. The last part of this work was dedicated to the model Akp2/P301S, which combines P301S-tau transgene with a haploinsufficiency for the tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNAP), which has phosphatase activity on tau. Taking into account that tau protein, once dephosphorylated by this exoenzyme, can induce apoptosis in neighbouring neurons, our goal was to determine if decreased levels of TNAP could lower this neurotoxic effect, thus interfering with or slowing down the progression of the neurodegenerative damage.

We observed in our P301S model a dramatic decrease in survival time (with a median of 11.7 months), which stemmed from a motor-paralysis phenotype that usually made its debut around 9 months of age. At this point, the mouse showed an overexpression and a hyperphosphorylation of the transgenic tau protein, both in the hippocampus and in the sciatic nerve, hippocampal atrophy with increased cell death, reactive gliosis, and axonal degeneration in the sciatic nerve along with motor issues that were patent on the rotarod test; mice also displayed hyperactivity, and no differences with control mice were found regarding hippocampus-dependent memory and spatial navigation. An increased adult neurogenesis was found (with no differences with control mice in respect of dendritic morphology) which could be acting as a compensatory mechanism for neuronal damage and explain the hippocampal-function endurance despite the observed neurodegeneration; the beginning of the transgene expression was found in late stages of this process.

Akp2/P301S mice showed the same signs of neurodegeneration in the CNS as the P301S model, as well as an increased adult neurogenesis, but differences were found in the PNS: we observed a recovery, returning to control levels, of axonal degeneration of the sciatic nerve and motor performance. These results reinforce the hypothesis of a deceleration in the progression of the pathology and encourage further exploration of the therapeutic value of TNAP inhibitors.

# 1 Introducción

## 1.1 Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (AD, *Alzheimer's disease*) es la forma más común de demencia, representando un 60-70 % de los casi 50 millones de casos de esta familia de patologías neurodegenerativas en todo el mundo; aparece normalmente a partir de los 65 años de edad, y se caracteriza por un deterioro cognitivo progresivo que afecta, en primer lugar, a la memoria a corto plazo.

En 1907 el neurólogo alemán Alois Alzheimer describió por primera vez la dolencia estudiando el caso de Auguste Deter [Alzheimer, 1907] [Alzheimer *et al.*, 1995]; esta paciente presentaba, a los 51 años de edad, síntomas clínicos como desorientación, pérdida de memoria, déficit perceptivo, afasia, agnosia y conductas anómalas. Tras su muerte a los 56 años de edad, Alzheimer pudo observar mediante la técnica de impregnación argéntica la aparición de abundantes ovillos neurofibrilares (NFT, *neurofibrillary tangles*) y placas seniles o neuríticas en su cerebro.

Tanto los NFT como las placas seniles se habían encontrado previamente en 1892 por Blocq y Marinesco en el cerebro de una anciana afectada de epilepsia [Blocq y Marinesco, 1882], y habían sido correlacionadas con demencia senil por Fischer en 1907 [Fischer, 1907]; pero es Alzheimer quien introduce una nueva enfermedad, una demencia que combina la aparición de ambos agregados proteicos junto con la pérdida de células nerviosas en la corteza cerebral. Emil Kraepelin en 1910 describe esta patología como una demencia presenil, proponiendo llamarla «enfermedad de Alzheimer» [Kraepelin, 1910].

Actualmente, el incremento de la población con edad avanzada se ha reflejado en un aumento en la incidencia de esta enfermedad. Aún no se dispone de marcadores biológicos específicos para el diagnóstico en vida del paciente; por ello, el diagnóstico neuropatológico después de la muerte es crucial para la determinación definitiva de la dolencia.

La composición de los dos principales marcas histopatológicas descritas por Alzheimer, ilustradas en la figura 1-1 (A), es la siguiente:

- NFT intraneuronales: formados por agregados de proteína tau aberrantemente fosforilada (P-tau, *phospho-tau*), denominados filamentos helicoidales apareados (PHF, *paired helical filaments*). Una vez la neurona muere, los NFT extracelulares remanentes son denominados ovillos fantasma (*ghost tangles*).
- Placas seniles extracelulares: formadas por filamentos del péptido  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ , *amyloid- $\beta$* ).

La distribución temporal y espacial de los ovillos neurofibrilares de proteína tau hiperfosforilada correlaciona mejor con la progresión de la enfermedad que la aparición de las placas seniles, asociadas también al envejecimiento normal [H. Braak y E. Braak, 1991] [Arriagada

*et al.*, 1992]. Desde hace décadas se ha identificado la corteza entorrinal como una de las primeras regiones afectadas por la presencia de los NFT [H. Braak y E. Braak, 1991], pasando posteriormente a afectar al hipocampo (en estas fases se ve comprometida la memoria a corto plazo); posteriormente, cuando los ovillos neurofibrilares aparecen en otras regiones corticales, los enfermos desarrollan demencia.

No obstante, también desde hace décadas se conoce la afectación temprana de otras estructuras en la AD, principalmente del núcleo noradrenérgico del puente troncoencefálico conocido como *locus coeruleus* [Mann *et al.*, 1980] [Bondareff *et al.*, 1982] [Haglund *et al.*, 2006], observándose así mismo niveles reducidos del transportador de noradrenalina [B. Gulyás *et al.*, 2010]. Estas neuronas de proyección difusa a la corteza cerebral presentan acumulaciones intracelulares de P-tau desde las etapas iniciales de la AD y el deterioro cognitivo leve [Grudzien *et al.*, 2007]; lesiones similares han sido identificadas en las primeras décadas de vida, incluso desde antes de la adolescencia [H. Braak y Del Tredici, 2011].

La AD se clasifica habitualmente en dos grandes grupos: de origen familiar (FAD, *Familial Alzheimer's disease*), monogénica, de aparición más temprana y etiología conocida, y la AD denominada esporádica, de etiología específica desconocida y de la que se conocen variantes genéticas que suponen factores de riesgo de carácter poligénico; la FAD representa menos del 5% del total de casos diagnosticados de la AD [Johns, 2014].

Se han identificado tres genes como causantes de la aparición de la FAD. El primero que se describió codifica para la proteína precursora amiloidea (APP, *amyloid precursor protein*), mientras que los otros dos codifican para proteínas conocidas como presenilinas (PS, *presenilin*): PS1 y PS2; estas dos proteínas transmembrana constituyen las subunidades catalíticas de los complejos  $\gamma$ -secretasa, proteasas que participan en el procesamiento de APP para producir el péptido A $\beta$  [Selkoe y J. Hardy, 2016].

Puesto que la forma familiar de la enfermedad está ligada al metabolismo de APP y el péptido A $\beta$ , para explicar el posible mecanismo subyacente a la forma esporádica se sugirió la llamada hipótesis amiloide de la AD [J. Hardy y Allsop, 1991] [Selkoe, 1991] [J. A. Hardy e Higgins, 1992] [Selkoe, 2001], reconsiderada recientemente [Kametani y Hasegawa, 2018]. Esta hipótesis propone que el origen de la patología se encuentra en la aparición de los agregados del péptido A $\beta$  y otros fragmentos del procesamiento de APP, acumulados por una disfunción en su metabolismo, y cuya producción se ve facilitada por las mutaciones asociadas a la FAD como hemos visto.

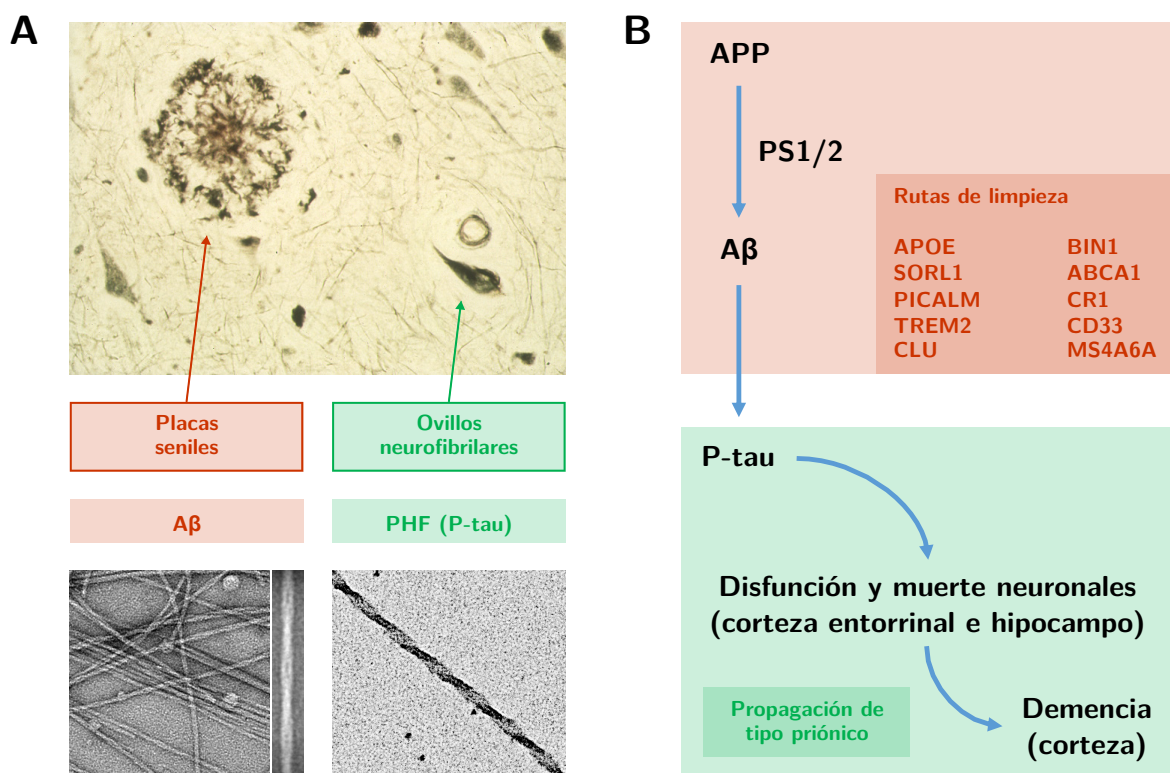
Posteriormente se describió que el péptido A $\beta$  agregado facilita la fosforilación de tau y, como consecuencia de esa fosforilación, su polimerización en PHF que finalmente agregan en forma de NFT, siendo la patología de tau la responsable última de la toxicidad, muerte neuronal y progresión de la enfermedad (hipótesis de tau).

Durante estos últimos años la hipótesis amiloide se ha complementado también con estudios de asociación del genoma completo (GWAS, *genome-wide association study*), que han permitido descubrir cómo algunas variantes de ciertos genes, como por ejemplo *APOE* (im-

plicado en la eliminación de  $A\beta$ ) [Strittmatter *et al.*, 1993] y *TREM2* (relacionado con la inmunidad innata mediada por microglia) [Jonsson *et al.*, 2013], aumentan la probabilidad de sufrir la enfermedad. Muchos de los genes que han sido relacionados con la AD esporádica están involucrados en rutas de limpieza de residuos celulares.

Finalmente, para explicar la progresión de la patología en forma de demencia, se ha incorporado más recientemente la hipótesis de la propagación de tipo priónico de tau, desde el origen de los NFT en la corteza entorrinal y el hipocampo, hasta su extensión al resto de la corteza. Así, se ha observado que la proteína tau extracelular es capaz de entrar en las neuronas vecinas y alterar el metabolismo de la proteína tau endógena, provocando su fosforilación y agregación [Frost *et al.*, 2009] [Clavaguera *et al.*, 2009]; en la sección 1.3 se amplía la información a este respecto.

Para una revisión de las principales hipótesis que acabamos de comentar, ver [Kametani y Hasegawa, 2018]. En la figura 1-1 (B) se resumen los citados mecanismos posiblemente involucrados en la etiología de la AD esporádica.



**Figura 1-1: Enfermedad de Alzheimer.** (A) Principales marcas histopatológicas: placas seniles, formadas por filamentos de  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ), y ovillos neurofibrilares, compuestos por agregados de tau hiperfosforilada (P-tau) en forma de filamentos helicoidales apareados (PHF). (B) Modelo de la hipótesis amiloide sobre la etiología de la enfermedad (APP: proteína precursora amiloidea; PS1/2: presenilina 1/2), con la propagación de tipo priónico de tau para explicar la progresión de la demencia. Créditos de las imágenes: arriba [cedida amablemente por el laboratorio del Prof. Claude Wischik, de la Universidad de Aberdeen (Aberdeen, Reino Unido)], abajo-izq. [Gremer *et al.*, 2017], y abajo-der. [Pérez, Cuadros *et al.*, 2018].

## 1.2 La proteína tau y las taupatías

Tau se descubrió en 1975 como una proteína asociada a microtúbulos especialmente abundante en el cerebro [Weingarten *et al.*, 1975]. Su gen humano *MAPT* (*microtubule-associated protein tau*), ubicado en la posición cromosómica 17q21, contiene 16 exones a partir de los cuales, por *splicing* alternativo, se producen diferentes isoformas cuya presencia o proporción dependen de la etapa del desarrollo y de la localización, ya sea en el sistema nervioso central (CNS, *central nervous system*) o en el periférico (PNS, *peripheral nervous system*). Su interacción con los microtúbulos se produce a través de cuatro dominios de unión repetidos, codificados por los exones 9-12 y denominados R1-R4.

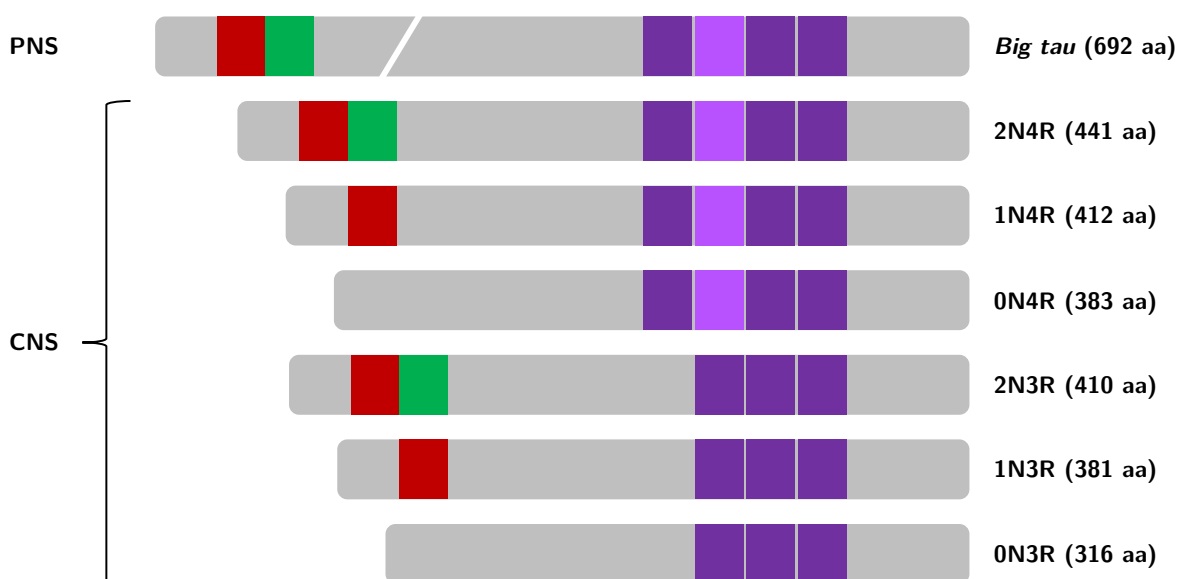
En el CNS se generan mayoritariamente seis isoformas a partir de *MAPT* según la presencia o ausencia de los exones 2 y 3 del extremo N-terminal, y del exon 10, que codifica para el segundo dominio de unión a microtúbulos, R2 [Andreadis *et al.*, 1992]. La inclusión del exón 10 da como resultado un conjunto de isoformas de tau con cuatro repeticiones del dominio de unión, denominadas 4R, mientras que las isoformas sin dicho exón tienen solo tres de estas repeticiones y son agrupadas con el término 3R; estas últimas variantes, por la ausencia de uno de los dominios de interacción con los microtúbulos, presenta una menor afinidad por estos y favorece un dinamismo incrementado [Llorens-Martin, Teixeira *et al.*, 2012]. De hecho, estas isoformas son las únicas presentes en los cerebros fetales en desarrollo tanto en ratones como en humanos, mientras que las formas 4R solo aparecen en las neuronas una vez alcanzada la madurez [Avila, Lucas *et al.*, 2004]; en humanos adultos pueden encontrarse ambas familias, 3R y 4R, en una proporción similar, mientras que en ratones la presencia de las isoformas 3R queda restringida a aquellas regiones que presentan neurogénesis adulta [Fuster-Matanzo, Barreda *et al.*, 2009] [Fuster-Matanzo, Llorens-Martín, Jurado-Arjona *et al.*, 2012].

En el PNS, las isoformas mayoritarias incluyen constitutivamente el exón 4A, produciendo una variante de 110 kDa de peso molecular conocida como *big tau* [Goedert, Spillantini *et al.*, 1992] [Andreadis, 2005]. El *splicing* alternativo de los exones 2, 3 y 10 en esta localización aún no ha sido analizado en detalle [Arendt *et al.*, 2016].

Las principales isoformas de tau que hemos repasado, tanto en el sistema nervioso central como en el periférico, se encuentran resumidas en la figura 1-2.

La proteína tau es considerada intrínsecamente desestructurada, al carecer de estructuras secundaria y terciaria bien definidas; su conformación se puede aproximar a la denominada como ovillo estadístico (*random coil*), donde la falta de interacciones estables entre los residuos hace que las estructuras fluctúen entre todas las posibles (para una revisión, ver [Avila, Jiménez *et al.*, 2016]). Las proteínas total o parcialmente desestructuradas forman agregados en distintas enfermedades neurodegenerativas humanas como son la de Huntington, Creutzfeldt-Jakob, Parkinson, Alzheimer, y en otras taupatías; en muchos casos, incluyendo tau, el mecanismo molecular y la estructura detallada del agregado final no se conocen con

exactitud [Avila, Jiménez *et al.*, 2016]. Con respecto a los agregados fibrilares de tau, se han observado, en aquellos obtenidos de cerebros humanos de pacientes con AD, conformaciones moleculares patológicas específicas [Dregni *et al.*, 2019]; mediante agregación *in vitro* inducida por heparina se han podido comprobar estructuras polimórficas en isoformas 4R, con una conformación única de lámina  $\beta$  para el núcleo fibrilar, alrededor de R2-R3, y una dinámica heterogénea fuera de este núcleo rígido: las repeticiones R1 y R4 son semirrígidas, y la región rica en prolinas previa a los dominios de unión a microtúbulos presenta una gran movilidad [Dregni *et al.*, 2019].



**Figura 1–2: Principales isoformas de tau en el humano adulto.** Se representan las variantes más abundantes, obtenidas por *splicing* alternativo, tanto en el sistema nervioso periférico (PNS), con la isoforma que incluye el exón 4A conocida como *big tau*, como en el sistema nervioso central (CNS), con sus seis isoformas según la inclusión o exclusión de los exones 2 (rojo) y 3 (verde), en el extremo N-terminal, y del exón 10 (morado), que codifica para la segunda repetición del dominio de unión a microtúbulos; los exones 9, 11 y 12, que codifican para las otras tres repeticiones pero no sufren *splicing* alternativo, aparecen en color morado. A la derecha aparecen los identificadores de las isoformas del CNS según el número de exones incluidos del extremo N-terminal (N) y el número de repeticiones del dominio de unión a microtúbulos (R), además de las longitudes en número de residuos de aminoácidos (aa) de todas las variantes.

En el cerebro, la proteína tau se encuentra principalmente en las neuronas, pero también está presente a bajas concentraciones en células gliales [LoPresti *et al.*, 1995]. Dentro de las neuronas, esta proteína se localiza predominantemente asociada a los microtúbulos axonales [Dotti, Banker *et al.*, 1987]; cuando se fosforila, tau puede hallarse también en las espinas dendríticas [Ittner, Ke *et al.*, 2010], donde su función fisiológica no se conoce bien todavía, habiéndose propuesto su participación en la regulación de la plasticidad sináptica [Frandsen *et al.*, 2014]. Por otro lado, también se ha descrito su presencia asociada a



la membrana plasmática [Arrasate, Pérez *et al.*, 2000] o en el núcleo celular [Sultan *et al.*, 2011] [Camero *et al.*, 2014]. La expresión en el cerebro humano muestra una considerable variación regional, siendo los niveles de tau más bajos en el cerebelo y los más altos en el neocórtex [Trabzuni *et al.*, 2012]; este hecho podría contribuir a la vulnerabilidad diferencial de las distintas regiones cerebrales en las patologías asociadas a esta proteína.

En las neuronas, la función principal considerada tradicionalmente es la de la estabilización de los microtúbulos, como ya se ha mencionado; no obstante, estudios recientes apuntan a que, en realidad, su papel podría estar más inclinado a permitir que los microtúbulos axonales tengan largos dominios inestables, precisamente compitiendo con otras moléculas estabilizadoras [Baas y Qiang, 2019]. La proteína tau también regula el transporte axonal al competir con las proteínas motoras dineína y kinesina por la unión a los microtúbulos [Stamer *et al.*, 2002]; además, tau es esencial para el crecimiento y maduración axonal durante el desarrollo [Knops *et al.*, 1991]. La presencia de esta proteína en el compartimento nuclear ha intrigado a los investigadores; actualmente se cree que es clave para mantener la integridad del DNA genómico, así como del RNA nuclear y citoplasmático [Sultan *et al.*, 2011] [Camero *et al.*, 2014]. Finalmente, otras funciones descritas de tau incluyen la regulación de la actividad neuronal y de otros procesos en la neurogénesis adulta [Fuster-Matanzo, Barreda *et al.*, 2009] [Pallas-Bazarra *et al.*, 2016], la exportación de hierro [Avila, Barreda *et al.*, 2013], y la participación en el proceso de depresión a largo plazo sináptica (LTD, *long-term depression*) [Kimura *et al.*, 2014].

La regulación de la función de la proteína tau se logra predominantemente a través del proceso de fosforilación, y depende de los residuos aminoacídicos donde esta se produzca. Un incremento en los niveles de fosforilación reduce su afinidad por los microtúbulos, lo que resulta en la inestabilidad y dinamismo del citoesqueleto neuronal (para una revisión, ver [Medina *et al.*, 2016]); aunque, como hemos mencionado previamente, esta idea ha sido recientemente cuestionada, al menos parcialmente [Baas y Qiang, 2019]. La hiperfosforilación de tau desencadena un proceso patológico al provocar una relocalización aberrante de esta proteína desde los axones hasta el compartimento somatodendrítico, donde se acumula, causando una disfunción sináptica [Hoover *et al.*, 2010] [Zempel *et al.*, 2010]. Una segunda consecuencia de la hiperfosforilación de esta proteína es la alteración de los mecanismos para su proteólisis mediante autofagia o el proteasoma [Y. Wang y Mandelkow, 2012], y de su truncamiento por proteasas [Zhou *et al.*, 2018]. En tercer lugar, se considera que la fosforilación de tau promueve su agregación, encontrándose ambas muy incrementadas en la AD [Grundke-Iqbal *et al.*, 1986]; el papel neurotóxico de los agregados sigue siendo debatido en la actualidad, pues se ha sugerido que, al igual que en otras enfermedades neurodegenerativas [Arrasate, Mitra *et al.*, 2004], estos serían protectores al disminuir las especies solubles de tau hiperfosforilada [Cowan y Mudher, 2013].

El estado de fosforilación de tau es el resultado del balance entre la acción de quinasas y fosfatasas sobre esta proteína [Avila, 2008]. La principal quinasa descrita de tau

es la GSK-3 $\beta$  (*glycogen-synthase kinase-3 $\beta$* ), una quinasa de proteínas específica de serina/treonina [Hernandez *et al.*, 2013]. Varias fosfatasas han sido implicadas en el proceso de desfosforilación de la proteína tau, siendo la mayoría pertenecientes a la familia PP (*protein phosphatase*): PP1, PP2A, PP2B (calcineurina) y PP2C; no obstante, esta última, a pesar de tener funcionalidad de desfosforilación sobre tau *in vitro*, no es capaz de desfosforilar la proteína tau hiperfosforilada procedente de extractos de cerebros de pacientes de AD [Avila, Lucas *et al.*, 2004].

Además de la fosforilación, otras modificaciones postraduccionales regulan la actividad de esta proteína; entre ellas se encuentran la acetilación, glicación, glicosilación, desamidación, isomerización, nitración, metilación, ubiquitinación, sumoilación y truncamiento (para una revisión, ver [Avila, Lucas *et al.*, 2004] y [Martin *et al.*, 2011]).

Algunas modificaciones, como la O-glicosilación, pueden prevenir la hiperfosforilación de tau e inhibir su agregación [Robertson *et al.*, 2004]; de hecho, en los cerebros de pacientes con AD se ha encontrado que la N-glicosilación está aumentada [J. Z. Wang *et al.*, 1996], mientras que la O-glicosilación parece estar reducida [Robertson *et al.*, 2004], en consonancia con los fenómenos generales de hiperfosforilación y agregación observados en esta patología. Otras modificaciones postraduccionales afectan a la degradación de tau; entre ellas se encuentran la acetilación [Min, Cho *et al.*, 2010], ubiquitinación [Babu *et al.*, 2005] y sumoilación [Luo *et al.*, 2014].

Finalmente, el truncamiento de tau se produce en la AD y otras patologías ligadas a esta proteína, y es probable que juegue un papel importante en estas enfermedades, ya que los fragmentos de tau no solo son propensos a la agregación, sino que también pueden inducir la neurodegeneración de forma independiente a esta (para una revisión, ver [Y. Wang y Mandelkow, 2016]).

Las taupatías son un grupo de demencias que presentan como característica común una alteración en el metabolismo de la proteína tau, bien sea por una mutación directa en el gen *MAPT*, mutaciones en otros genes como en el caso de la FAD, o por razones desconocidas en taupatías denominadas como esporádicas [Avila, Lucas *et al.*, 2004]; se dividen en dos categorías: taupatías primarias y secundarias [Fuster-Matanzo, Hernández *et al.*, 2018]. Las primeras comprenden trastornos en los que la patología asociada a tau es la característica neuropatológica principal, como por ejemplo en la demencia frontotemporal con parkinsonismo ligada al cromosoma 17 (FTDP-17, *frontotemporal dementia with parkinsonism linked to chromosome 17*) y la enfermedad de Pick. En la segunda categoría existe una alteración de otra proteína que contribuye a la enfermedad, como puede ser una de naturaleza amiloide; este grupo incluye la AD, tanto familiar como esporádica, el síndrome de Down o la demencia pugilística.

Las taupatías también pueden ser subclasificadas atendiendo a la acumulación preferencial de las isoformas 3R o 4R, dado que la proporción 3R/4R se ve afectada por la desregulación del *splicing* del exón 10, que puede suceder por mutaciones intrónicas en regiones

contiguas a este exón y también en demencias frontotemporales esporádicas por mecanismos patogénicos desconocidos [V. M. Lee y Trojanowski, 1999].

La FTDP-17 reúne un conjunto heterogéneo de enfermedades genéticas extremadamente raras debidas a mutaciones mapeadas en la posición cromosómica 17q21; la inmensa mayoría han sido identificadas en el gen *MAPT* (unas 38 mutaciones localizadas en alrededor de 100 familias) [Wszolek *et al.*, 2006], pero otras mutaciones se han hallado en el gen de la progranulina (*PGRN*), un factor de crecimiento secretado con funciones de regulación en procesos como desarrollo, reparación de lesiones e inflamación, además de estar estrechamente relacionado con mecanismos de formación de tumores [Baker *et al.*, 2006]. De este modo, y de manera sorprendente, las mutaciones en dos genes situados muy próximos en la misma región cromosómica producen enfermedades con fenotipos similares aparentemente a través de mecanismos diferentes (para una revisión, ver [Boeve y Hutton, 2008]).

Las taupatías agrupadas bajo la denominación FTDP-17 son autosómicas dominantes, con una penetrancia incompleta para la mayoría de los subtipos, que se manifiestan por una combinación variable de cambios de comportamiento y personalidad, deterioro cognitivo e importantes trastornos motores. La heterogeneidad en las patologías no solo se da entre familias con mutaciones diferentes, sino también dentro de la misma familia con una mutación determinada [Wszolek *et al.*, 2006].

A nivel histopatológico, en la FTDP-17 se producen inclusiones citoplasmáticas de la proteína tau hiperfosforilada (muy similares a aquellas de la AD) en todos los casos de mutaciones de *MAPT*, y se da una muerte neuronal gradual que desencadena la atrofia de los lóbulos temporales y frontales [Wszolek *et al.*, 2006]; para las mutaciones localizadas en el gen *PGRN*, se han hallado agregados ubiquitinados no inmunorreactivos contra tau, tanto citoplasmáticos como intranucleares, de composición desconocida [Baker *et al.*, 2006].

La mutación P301S en el gen *MAPT*, clasificada también dentro de la FTDP-17, ha sido descrita en detalle en dos familias de origen europeo, una de origen japonés y otra de origen judío [Bugiani *et al.*, 1999] [Sperfeld *et al.*, 1999] [Yasuda *et al.*, 2000] [Lossos *et al.*, 2003]. Esta mutación se da en el exón 10 que codifica para el dominio R2 de unión a microtúbulos, afectando por lo tanto solo a las isoformas 4R; produce un fuerte efecto inhibitorio del ensamblaje de microtúbulos promovido por tau, a la vez que estimula la agregación de esta proteína en filamentos en presencia de heparina; el *splicing* alternativo de dicho exón no se ve afectado [Lossos *et al.*, 2003].

Con respecto al fenotipo que presentan los enfermos con la mutación P301S, es en general más agresivo que el producido por la mutación P301L; a pesar de diferencias considerables entre los pacientes, se pueden destacar como características comunes un debut temprano del fenotipo (en la tercera/cuarta década de vida), cursando con cambios de personalidad que evolucionaron en pocos años a una demencia severa con numerosos problemas motores [Lossos *et al.*, 2003]; en las familias europeas fueron descritos, además, ataques epilépticos en los enfermos [Bugiani *et al.*, 1999] [Sperfeld *et al.*, 1999].

### 1.3 Proteína tau extracelular

Aunque la proteína tau es principalmente intracelular, también se encuentra en el medio intersticial y en el líquido cefalorraquídeo [Yamada *et al.*, 2011], tanto en forma de monómeros como de oligómeros o agregados mayores [Hampel, Teipel *et al.*, 2004]. El hecho de haberla hallado en individuos controles y en ratones que sobreexpresan tau humana antes de la detección de muerte neuronal sugirió que tau podría estar siendo secretada por las neuronas al medio extracelular de manera fisiológica; de hecho, posteriormente se observó que esta proteína se libera por ejemplo en respuesta a un aumento de la actividad neuronal [Yamada *et al.*, 2011] [Pooler *et al.*, 2013].

Por otro lado, tras comprobar el incremento de tau en el líquido cefalorraquídeo en pacientes de taupatías como la AD, se propusieron varias explicaciones posibles, no mutuamente excluyentes, como la liberación tras la muerte neuronal [Gómez-Ramos, Díaz-Hernández *et al.*, 2006], un aumento en su secreción ligado a estas enfermedades o la existencia de mecanismos de secreción exclusivos de condiciones patológicas [Pernègre *et al.*, 2019].

Numerosas publicaciones en los últimos años apoyan la idea de que la patología asociada a la proteína tau se extiende por todo el cerebro en la AD y otras taupatías como consecuencia de la propagación de determinadas especies de esta proteína entre regiones cerebrales conectadas en un proceso similar al descrito en las enfermedades priónicas; de hecho, estos mecanismos se están proponiendo también para otras dolencias neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson (para una revisión, ver [Duyckaerts *et al.*, 2019]). A pesar de que los mecanismos de propagación no son comprendidos completamente, se ha podido comprobar este fenómeno tanto en cultivos celulares como en modelos animales de taupatía, incluso en ausencia de muerte celular [Frost *et al.*, 2009] [Clavaguera *et al.*, 2009] [Calignon *et al.*, 2012]; además, se está acumulando evidencia de que la propagación se da transinápticamente, es decir, que tau es liberada por la neurona presináptica y captada por la postsináptica, donde induce la fosforilación y agregación de la proteína endógena, continuando la extensión de la patología a lo largo del circuito sináptico [Pérez, Medina *et al.*, 2018] [Pernègre *et al.*, 2019].

Con respecto a la exportación de tau al medio extracelular, se ha comprobado que la acumulación intracelular de esta proteína por encima de los niveles fisiológicos normales favorece su secreción por medio de vesículas membranosas [Simón *et al.*, 2012]; este aumento en los niveles de tau intracelular puede ocurrir de manera fisiológica durante el envejecimiento, debiéndose, al menos en parte, a una hiperactividad hipocampal asociada a este proceso [Huijbers *et al.*, 2019]. En situaciones patológicas, como es el caso de las taupatías, la acumulación de tau en el interior de las neuronas se ha relacionado bien directamente con mutaciones en el gen *MAPT* [Clavaguera *et al.*, 2009] [Karch *et al.*, 2012], o con alteraciones en las dos principales vías de degradación, la de la ubiquitina-proteasoma y la autofágica-lisosomal [Y. Wang, Martínez-Vicente *et al.*, 2009] [M. J. Lee *et al.*, 2013] [Chesser *et al.*, 2013]; ciertas modificaciones postraduccionales han sido asociadas con estas alteraciones y

con la intensificación de la acumulación (y, por tanto, de la secreción) de la proteína tau, tal y como hemos mencionado en el apartado anterior.

La principal modificación postraducciona sobre tau, con respecto a la estimulación de la secreción, es la fosforilación; por ejemplo, en células HeLa se ha observado que tanto la fosforilación como el truncamiento en su extremo C-terminal favorecen la secreción de esta proteína [Plouffe *et al.*, 2012]. No obstante, todavía no está clara la relación entre estos procesos, ya que ambas especies de tau, la fosforilada y la no fosforilada, se han detectado en el espacio extracelular; un estudio realizado en cultivos primarios de neuronas corticales mostró la liberación de tau fosforilada en condiciones control [Pooler *et al.*, 2013], mientras que otros grupos han informado de la secreción de especies tanto fosforiladas como no fosforiladas en dichos cultivos [Plouffe *et al.*, 2012]; además, se ha descrito en pacientes de AD un aumento de la fosforilación en el residuo Thr231 de la proteína tau en el líquido cefalorraquídeo [Hampel, Burger *et al.*, 2005], pero también se observó una disminución de dicha fosforilación según progresaba la enfermedad [Hampel, Buerger *et al.*, 2001]. Finalmente, es necesario tener en consideración en este escenario la posible acción de fosfatasa extracelulares sobre las especies de tau liberadas al medio; en la sección 1.6 se tratará este aspecto.

Profundizando en las vías de secreción mediante vesículas membranosas, tau ha sido localizada en exosomas [Saman *et al.*, 2012] [Simón *et al.*, 2012] [Y. Wang, Balaji *et al.*, 2017] y en ectosomas [Dujardin *et al.*, 2014], habiéndose comprobado en modelos animales cómo los exosomas neuronales que contienen tau humana mutada resultan tóxicos *in vivo* para las neuronas del ratón receptor [Winston *et al.*, 2018]; por otro lado, en la AD también han sido hallados exosomas conteniendo el péptido A $\beta$  y otros fragmentos del procesamiento de APP [Rajendran *et al.*, 2006] [Sharples *et al.*, 2008] [Perez-Gonzalez *et al.*, 2012] [Sardar Sinha *et al.*, 2018]. Además de los anteriores, se han propuesto mecanismos no convencionales de secreción constitutiva de la proteína tau como la traslocación directa [Chai *et al.*, 2012]. Para una revisión en profundidad de las vías de secreción de esta proteína, ver [Pérez, Medina *et al.*, 2018] y [Pernègre *et al.*, 2019].

La captación de tau del espacio extracelular, donde se encuentra en forma libre o asociada a vesículas, ha sido investigada por numerosos grupos, pero los mecanismos precisos de unión y entrada a la célula receptora aún no se comprenden por completo; se han sugerido vías de entrada como la endocitosis mediada por receptor, macropinocitosis dependiente de actina mediada por proteoglicanos, o incluso nanotubos de membrana directos entre célula donadora y célula receptora [Pérez, Medina *et al.*, 2018]. Parece que tanto la conformación como el tamaño del agregado influyen en la captación de tau: solo los oligómeros y fibrillas pequeñas que se unen a la membrana citoplasmática, pero no los monómeros ni las fibrillas y filamentos largos, podrían ser internalizados por un mecanismo independiente del receptor [Wu *et al.*, 2013]; también se ha observado una influencia de la composición en isoformas de los oligómeros en la eficiencia de esta internalización [Swanson *et al.*, 2017]. Por último, se ha descrito que la entrada de tau del medio extracelular no solo tiene lugar en neuronas,

sino también en otras células como la microglía [Bolós *et al.*, 2017]. Para una revisión de los mecanismos de captación de tau, ver [Mohamed *et al.*, 2013] y [Guo y V. M. Lee, 2014].

Una vez dentro de la célula receptora, la proteína tau exógena ha sido localizada a lo largo de la ruta endocítica tanto en endosomas tempranos como tardíos, además de asociada a vesículas lisosomales en rutas axonales retrógradas [Frost *et al.*, 2009]. Los oligómeros y fibrillas de tau internalizados con determinadas conformaciones anómalas pueden inducir la polimerización de la proteína tau endógena, interrumpiendo el transporte axonal rápido anterógrado y retrógrado [Frost *et al.*, 2009] [Pérez, Medina *et al.*, 2018]. Se ha podido comprobar en cultivos celulares que son necesarios determinados estados de agregación para conferir a la proteína tau captada su capacidad de inducir el ensamblaje de la endógena, dependiendo la potencia para esta inducción del estado conformacional de los agregados internalizados [Falcon *et al.*, 2015].

## 1.4 Modelos animales de taupatías

Se han generado multitud de modelos animales que han resultado ser exitosos en proporcionar información sobre los mecanismos moleculares de las taupatías como la AD, así como la relación directa entre su neuropatología y el comportamiento [Alzforum, 2019]. Los modelos de ratón, en los que nos centraremos en este apartado, han ayudado a aclarar la relación entre las formas patológicas de la proteína tau, la muerte celular y la aparición de la enfermedad, así como la interacción entre esta proteína y otras moléculas asociadas con las taupatías, como el péptido A $\beta$ .

Tras el descubrimiento de que el gen *MAPT* para la proteína tau presentaba mutaciones en diferentes pacientes con FTDP-17, a lo largo de los años se han producido numerosas líneas transgénicas con los cDNA que codifican para diferentes isoformas con algunas de estas versiones mutadas de tau, así como ratones que modelan la enfermedad a través de la sobreexpresión de ciertas quinasas con un papel clave en la hiperfosforilación de esta proteína [Gomez-Sintes *et al.*, 2011]; así mismo, se han generado animales que sobreexpresan tau en combinación con diferentes proteínas mutantes que se asocian a formas familiares de la AD, tanto APP como las presenilinas que participan en su procesamiento.

Todos estos animales han permitido modelar diferentes aspectos de la enfermedad y han reproducido las dos marcas histopatológicas más importantes, los NFT y las placas seniles. Sin embargo, muchas de las estrategias farmacológicas que se han derivado del estudio de la patología en estos modelos han fallado cuando se han llevado a la clínica; uno de los principales problemas ante los pacientes humanos es que en ellos se interviene cuando la enfermedad comienza a mostrar síntomas neurológicos, momento en el que los daños sobre el sistema nervioso están ya muy avanzados.

El primer ratón transgénico de *MAPT* que se generó expresaba la isoforma 4R de tau bajo el control del promotor de *Thy1.2*; presentaba fosforilación de esta proteína en sitios



que generalmente se encuentran modificados en muestras humanas de pacientes de AD, aunque no mostraba NFT: la histopatología observada en estos animales reflejaba una etapa temprana previa a la formación de los ovillos neurofibrilares [Götz, Probst *et al.*, 1995]. En otro modelo de ratón en el que la isoforma 3R de tau humana se sobreexpresaba bajo el promotor murino de la reductasa de la HMG-CoA se pudo detectar la proteína tau transgénica en el compartimento somatodendrítico, aunque nuevamente no se observó la formación de NFT [Brion, Tremp *et al.*, 1999].

Los modelos de ratones transgénicos posteriores se diseñaron utilizando promotores más fuertes, lo que resultó en un aumento de la expresión en estos animales hasta que finalmente se pudieron detectar agregados de tau en el cerebro [Ishihara, M. Hong *et al.*, 1999] [Spittaels *et al.*, 1999]; estos modelos no solo mostraron fenotipos similares a los descritos en la AD en neuronas, sino que también presentaban agregados de tau esféricos en la médula espinal, lo que dio como resultado síntomas motores en los animales [Probst *et al.*, 2000]. Si bien los ratones transgénicos con una sobreexpresión excesiva de tau humana no son viables, se han generado líneas que sobreexpresan tau a niveles inferiores a diez veces los niveles endógenos donde se han observado inclusiones de esta proteína en las neuronas corticales, del tronco encefálico y de la médula espinal, acompañadas de otros síntomas como la degeneración axonal y déficits motores; la tinción de las inclusiones con los colorantes específicos empleados en la AD, como son el rojo Congo y la tioflavina-S, reveló un aumento de la insolubilidad de los agregados a lo largo del tiempo e inclusiones similares a los NFT en animales viejos [Ishihara, Zhang *et al.*, 2001].

Otros modelos con el gen de tau bajo el promotor de la proteína priónica murina (*Prnp*) llevaron a la expresión de niveles altos en ciertos tipos de neuronas y células gliales; en este caso, las estructuras fibrilares pudieron detectarse tanto en glía (oligodendrocitos) como en neuronas [Götz, Tolnay *et al.*, 2001]. El fenotipo, sin embargo, todavía no era grave: en un modelo de ratón que expresaba las tres isoformas 3R de tau humanas utilizando un minigén bajo el promotor de la  $\alpha$ -tubulina, se observaron estructuras similares a las placas astrocíticas características de la materia gris en la taupatía conocida como degeneración corticobasal, pero las células neuronales no se vieron tan afectadas ya que no mostraban agregados fibrilares [Higuchi *et al.*, 2002].

Aunque hasta el día de hoy no se han encontrado mutaciones en *MAPT* en pacientes de AD, el análisis molecular de la FTDP-17 ha revelado mutaciones características en este gen; se ha observado por ejemplo que algunas de ellas, como P301L o R406W, reducen el potencial de tau para promover el ensamblaje de los microtúbulos [Hasegawa *et al.*, 1998]. En modelos de ratón que expresan una isoforma de tau humana que contiene la mutación P301L se encontró que esta mutación reduce la afinidad de tau por los microtúbulos; los ratones presentaron NFT en el cerebro y en la médula espinal, junto con una reducción sustancial en el número de neuronas motoras, desarrollando además graves déficits de comportamiento que emulan los síntomas neurológicos de la enfermedad en humanos [Lewis *et al.*, 2000]. En otro estudio

con ratones sobreexpresando tau con esta misma mutación se aislaron filamentos cortos de esta proteína de los cerebros de los animales [Götz, Tolnay *et al.*, 2001]. Curiosamente, otro equipo reveló que, cuando se suprimía la expresión de la proteína mutante tau-P301L después de un período de sobreexpresión, los síntomas de comportamiento alterado en estos ratones podían revertirse, mientras que los NFT insolubles continuaron acumulándose [Santacruz *et al.*, 2005]; este resultado alude a la posibilidad de que la proteína tau soluble, en lugar de sus depósitos fibrilares, sea la causa de la muerte de las células neuronales en estas patologías, tal y como hemos mencionado en la sección 1.2.

El grupo de Frank LaFerla generó un modelo de ratón transgénico triple que expresaba dos mutaciones de FAD, PS1-M146V y la mutación doble conocida como sueca (*Swedish*) APP-KM670/671NL, además de la mutación de FTDP-17 tau-P301L; su objetivo era examinar las interacciones entre el péptido A $\beta$ , los NFT y la disfunción neuronal. Estos ratones, denominados 3 $\times$ Tg-AD, desarrollaron las dos características clásicas de la enfermedad de Alzheimer en pacientes humanos, placas seniles y ovillos neurofibrilares; además, la plasticidad y la potenciación a largo plazo (LTP, *long-term potentiation*) sinápticas se vieron comprometidas [Oddo *et al.*, 2003].

En 2002, el laboratorio de Michael Goedert generó un ratón transgénico que expresaba la proteína tau humana con la mutación P301S bajo el promotor de *Thy1.2*; como hemos visto en la sección 1.2, esta mutación es responsable en humanos de la presentación de una patología FTDP-17 de inicio temprano y progresión rápida. En este modelo se hallaron numerosos agregados de tau en el cerebro y la médula espinal, siendo las neuronas motoras las que mayor concentración de esta proteína mostraban; la colocalización de depósitos de tau hiperfosforilada con quinasas pertenecientes a la familia MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) indicaba la posible implicación de estas enzimas en la modificación de la proteína tau transgénica [Allen *et al.*, 2002].

En 2007, el equipo de Virginia Lee creó otro ratón portando la proteína tau-P301S humana, en este caso bajo el promotor de *Prnp*, que mostraba NFT junto a una pérdida masiva de neuronas del hipocampo y corticales entre los 9 y los 12 meses de edad; curiosamente, los déficits en la función sináptica comenzaron mucho antes de la formación de los NFT, aproximadamente a los tres meses de edad [Yoshiyama *et al.*, 2007]. Dado que también se observó una activación microglial temprana y que la patología de tau podía revertirse hasta cierto punto mediante la administración del fármaco inmunosupresor FK506, los autores del estudio establecieron un vínculo entre la neuroinflamación y las etapas iniciales en el desarrollo de las taupatías; en este sentido, ratones deficientes de la proteína TREM2 (a la que se le atribuyen funciones antiinflamatorias mediadas por microglía) y que sobreexpresan la proteína tau humana mostraron una hiperfosforilación y agregación aceleradas y exacerbadas de esta proteína [Bemiller *et al.*, 2017].

Las líneas con las mutaciones P301S y P301L son frecuentemente utilizadas como modelos de FTDP-17 y de otras taupatías como la AD. El ratón transgénico tau-P301S del laboratorio



de Virginia Lee, conocido como PS19, fue el escogido como modelo principal para el trabajo presentado en esta tesis; se amplía la información sobre él en las secciones 3.1, 4 y 5.

Otro modelo animal generado a partir de mutaciones presentes en enfermos de FTDP-17 es el ratón que sobreexpresa la proteína tau humana con la delección  $\Delta K280$ , una mutación que *in vitro* promueve fuertemente la agregación de tau, además de aumentar la proporción de isoformas 3R sobre las 4R al afectar al *splicing* del exón 10, y que en pacientes humanos también deja abundantes agregados de tau y una mayor cantidad de isoformas 3R, tanto en fracciones insolubles como solubles y a nivel de transcritos de mRNA [Swieten *et al.*, 2007]. En un modelo murino inducible de esta delección se observaron NFT a edades avanzadas (más de 24 meses), pero los animales desarrollan una extensa patología previa con tan solo tres meses de expresión del transgén, incluyendo la ubicación aberrante de tau en el compartimento somatodendrítico y cambios conformacionales indicativos de agregación e hiperfosforilación [Eckermann *et al.*, 2007].

En la AD también se generan fragmentos de la proteína tau cuya toxicidad se ha comprobado en experimentos *in vitro*. Con esta idea se diseñó un modelo transgénico que expresa una forma truncada de tau humana, que carece de los últimos 20 aminoácidos del extremo C-terminal, producida por acción de caspasas; este modelo muestra un rápido deterioro cognitivo asociado a la formación de oligómeros de tau [Kim *et al.*, 2016].

Con objeto de estudiar la propagación de la enfermedad a través de un mecanismo priónico se generó un ratón transgénico condicional para tau-P301L restringido a aquellas células con el promotor de la neuropsina activo, que se corresponde con un subconjunto de neuronas en la corteza entorrinal. En este modelo murino se pudo mostrar una propagación hasta el hipocampo de la patología asociada a la proteína tau similar a la que tiene lugar en los enfermos de AD [Calignon *et al.*, 2012].

Dado que una de las características más importantes de tau en la AD es la fosforilación en epítomos específicos no presentes en situaciones no patológicas, otro enfoque estratégico importante es identificar los sitios de fosforilación que están relacionados con la formación de agregados e identificar las enzimas —quinasas y fosfatasa— y vías responsables. La primera generación de ratones transgénicos que expresan la quinasa de tau GSK-3 $\beta$ , introducida en la sección 1.2, se generó utilizando promotores ubicuos o específicos del CNS; sin embargo, en todos los casos, aunque se pudieron observar ligeros aumentos en los niveles de fosforilación de tau, no se detectó una sobreexpresión de la enzima [Brownlee *et al.*, 1997]. Esto se debió probablemente a la existencia de una ventana reducida de concentraciones en las que GSK-3 $\beta$  puede expresarse, fuera de la cual la falta o el exceso de su actividad resulta letal.

Teniendo en cuenta el estrecho rango de concentraciones de GSK-3 $\beta$  que permite la viabilidad celular, se creó un modelo con la expresión de esta enzima ajustable por medio de un sistema condicional regulado por tetraciclina bajo el control del promotor de la CaMKII $\alpha$ ; esta construcción permitía, por tanto, realizar estudios de reversibilidad, y restringía la expresión condicional a un conjunto particular de neuronas corticales y del hipocampo [Lucas

*et al.*, 2001]. En este caso se logró la sobreexpresión de la quinasa, que condujo a la hiperfosforilación de tau y mostró cómo esta fosforilación disminuye su afinidad por los microtúbulos.

A pesar de la ausencia de agregados de la proteína tau, pudieron observarse en este ratón deficiencias de comportamiento relacionadas con la AD mediante la aplicación de la prueba del laberinto acuático de Morris [Hernández, Borrell *et al.*, 2002]. A continuación, se comprobó que el apagado de la sobreexpresión de GSK-3 $\beta$  a su vez conduce a una actividad normal de esta enzima, niveles normales de P-tau, disminución de la muerte neuronal y la supresión de los déficits cognitivos.

Para estudiar más a fondo el papel de esta enzima, se cruzó el ratón de sobreexpresión condicional de GSK-3 $\beta$  con un ratón modelo de taupatía denominado VLW; el ratón VLW incorpora las siguientes mutaciones de FTDP-17: G272V, P301L y R406W [Lim *et al.*, 2001]. El modelo resultante, GSK-3 $\beta$ /VLW, muestra hiperfosforilación de tau en las neuronas de la región de CA1 del hipocampo; es en esta área donde se superponen los patrones de expresión de los transgenes. Al contrario que en los modelos individuales, GSK-3 $\beta$  y VLW, en este modelo híbrido se hallaron filamentos de tau con una estructura similar a los PHF; estos agregados resultaron positivos para la tinción con tioflavina-S, al igual que los NFT propios de la AD. Todos estos datos sugieren que existe una contribución sinérgica de ambos tipos de modificaciones de tau, mutaciones e hiperfosforilación, para inducir una agregación aberrante de esta proteína [Engel, Lucas *et al.*, 2006].

El modelo GSK-3 $\beta$ /VLW se empleó también para estudiar los posibles efectos del litio, un inhibidor de la GSK-3 $\beta$  utilizado para tratar diferentes trastornos mentales con efectos bien documentados en humanos. Se abordaron dos cuestiones: primero, si el tratamiento crónico con litio puede prevenir la formación de agregados de tau aberrantes; y segundo, si el litio puede revertir los NFT ya formados para lograr su eliminación en animales de edad avanzada. Los resultados indicaron que este tratamiento es capaz de prevenir el desarrollo de la patología cuando se inicia de forma temprana en la progresión de la enfermedad; si la administración de litio comenzaba en etapas tardías, la hiperfosforilación de tau se reducía, pero no se consiguió revertir su agregación [Engel, Goñi-Oliver *et al.*, 2006].

Todos los datos que hemos comentado, descritos en distintos modelos de sobreexpresión de GSK-3 $\beta$ , respaldan el potencial de los inhibidores de esta quinasa en el tratamiento de la AD y otras taupatías [Engel, Hernández *et al.*, 2006] (para una revisión, ver [Avila y Hernández, 2007]).

## 1.5 Proteína tau y neurogénesis adulta

El proceso de generación de neuronas nuevas en humanos y ratones adultos tiene lugar, en condiciones fisiológicas, principalmente en dos áreas del cerebro: la zona subventricular, en los ventrículos laterales, y la zona subgranular (SGZ, *subgranular zone*), en la región del hipocampo conocida como giro dentado (DG, *dentate gyrus*).

En el presente trabajo nos centraremos en la SGZ cuando tratemos la neurogénesis adulta; la zona subgranular hipocampal fue el emplazamiento en el que se observó por primera vez la existencia de este proceso en humanos adultos: en 1998, el equipo liderado por Fred Gage logró identificar en esta región células progenitoras en muestras obtenidas *post mortem* de pacientes de cáncer a los que se habían inyectado análogos de timidina para evaluar la actividad proliferativa de sus tumores [Eriksson *et al.*, 1998].

La SGZ es el estrato de la capa de células granulares (GCL, *granule-cell layer*) más próximo a la región del *hilus* del giro dentado hipocampal. Las células madre que existen en esta localización, denominadas precursoras de tipo 1, de tipo glía radial (por su similitud a la glía radial del desarrollo embrionario), o células B (por su semejanza a los progenitores así denominados en la zona subventricular), constituyen el reservorio de células progenitoras de la SGZ; se pueden considerar un subconjunto del tipo celular astrocítico, y se caracterizan por la expresión de los marcadores GFAP, nestina, BLBP y SOX2, entre otros (para una revisión, ver [Doetsch y Hen, 2005]). Estas precursoras permanecen en grupos de dos a cuatro células en los llamados nichos neurogénicos, estructurados por los procesos astrocíticos y microvasculatura especializada [Seri *et al.*, 2004].

Las precursoras de tipo 1 no se caracterizan por una elevada tasa proliferativa en condiciones fisiológicas normales [Hüttmann *et al.*, 2003], pero sí pueden dividirse asimétricamente dando lugar a la siguiente subpoblación de progenitoras, denominadas de tipo 2 [Filippov *et al.*, 2003]. Las progenitoras de tipo 2, junto a las de tipo 3 derivadas de estas, son células con mayor proliferación que las de tipo 1, por lo que se denominan progenitoras de amplificación transitoria; la división mitótica, en este caso, es simétrica. Para identificar estas etapas se pueden emplear marcadores de proliferación celular como Ki-67 o fosfo-histona H3 (PH3); también, a partir de cierto punto, estos neuroblastos todavía con capacidad proliferativa comienzan a expresar marcadores como la doblecortina (DCX), que permanecerá durante la siguiente fase de migración y extensión de dendritas.

Al salir de la etapa proliferativa, las células progenitoras se transforman en neuronas posmitóticas inmaduras que, en su proceso de maduración, pasarán por las fases de migración, establecimiento de contactos dendríticos y axonales, e integración sináptica. En estas etapas, además de la DCX (que dejará de expresarse en algún punto durante el proceso de contacto de las neuritas), comenzarán a expresar marcadores característicos de neuronas maduras como NeuN, además de otros que, al igual que la doblecortina, se apagarán antes de finalizar el proceso madurativo, como es el caso de la calretinina (Calr).

Finalmente, las nuevas neuronas se integrarán en la red de neuronas granulares del giro dentado, recibiendo las aferencias de las vías perforantes procedentes de la corteza entorrinal a través de sus dendritas proyectadas a la capa molecular, y conectando sus axones a las neuronas de CA3 mediante las denominadas fibras musgosas (*mossy fibres*) del *hilus*. Se establecerán primero las sinapsis de tipo gabaérgico lento, a continuación las glutamatérgicas y, por último, las gabaérgicas rápidas; de este modo, el desarrollo de las neuronas en la

neurogénesis adulta recapitula ordenadamente los eventos que experimenta el hipocampo durante su desarrollo embrionario [Espósito *et al.*, 2005].

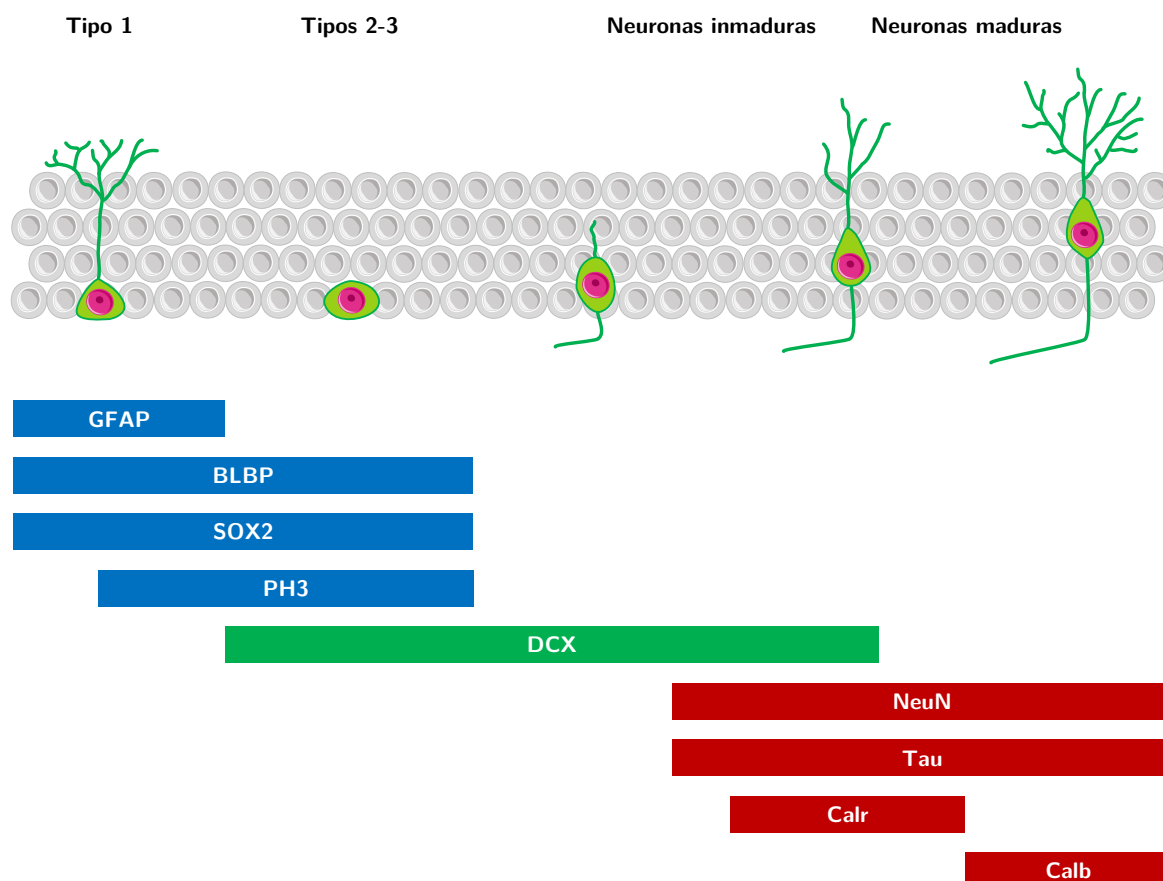
La activación sináptica glutamatérgica no se produce hasta dos o tres semanas tras la fase proliferativa, y es simultánea a la aparición de espinas en sus dendritas, dado que estas son los principales sitios postsinápticos de las neuronas granulares en los que recibir aferencias glutamatérgicas [C. Zhao *et al.*, 2006]; en esta etapa final las neuronas ya maduras dejarán de expresar el marcador calretinina y comenzarán a expresar la calbindina (Calb), que continuará indefinidamente a lo largo de su vida junto a otros marcadores como el ya mencionado NeuN. Entre cuatro y seis semanas después del comienzo de su proceso neurogénico, estas neuronas quedarán integradas completamente en el circuito sináptico hipocampal [Jones *et al.*, 2003]. En la figura 1–3 se esquematiza el proceso completo de neurogénesis adulta, con sus etapas y algunos de los marcadores característicos de cada fase (para una revisión, ver [Kempermann, Jessberger *et al.*, 2004]).

El proceso de polarización neuronal que ocurre durante la neurogénesis adulta también es similar al que se da en el desarrollo embrionario, que ha sido estudiado principalmente con neuronas hipocampales embrionarias de roedores *in vitro* [Dotti, Sullivan *et al.*, 1988]. La polaridad neuronal se logra principalmente gracias a un citoesqueleto polarizado y una distribución polarizada de las moléculas asociadas a este, siendo tau, como hemos visto, una de las proteínas características del axón. Precisamente esta proteína es una de las pocas axonales que nos permitirán marcar las nuevas neuronas, ya que la mayoría de los marcadores están localizados en el compartimento somatodendrítico o en el núcleo celular; tau comienza su expresión en las etapas iniciales de maduración posmitótica, de manera más o menos simultánea al marcador NeuN, y permanece durante el resto de la vida de la neurona.

La extensión de los procesos neuríticos requiere una red de microtúbulos dinámicos. A esto contribuye la expresión de la isoforma 3R de tau, como ya se ha mencionado en apartados anteriores; al igual que en el caso del desarrollo embrionario, esta variedad también es la mayoritaria en las neuronas durante el proceso de neurogénesis adulta, expresándose a partir de cierto momento en la fase DCX<sup>+</sup> y permitiendo visualizar sus axones de manera específica [Bullmann *et al.*, 2007] [Llorens-Martin, Teixeira *et al.*, 2012]. El aumento de la fosforilación, que también induce una reducción en la afinidad por los microtúbulos como hemos visto en estados patológicos, está presente fisiológicamente en estas nuevas neuronas [X. P. Hong *et al.*, 2010], algo que, de nuevo, muestra un paralelismo con la fosforilación observada en neuronas corticales durante el desarrollo embrionario [Brion, Octave *et al.*, 1994].

Para determinar el papel de la proteína tau en la neurogénesis adulta se ha analizado este proceso en varios estudios empleando ratones KO para dicha proteína. En uno de los casos, la neurogénesis adulta hipocampal se encontraba considerablemente disminuida en este modelo murino [X. P. Hong *et al.*, 2010]; otro equipo no halló cambios en la tasa de producción neurogénica en condiciones basales, aunque determinó, por un lado, que el modelo KO mostraba alteraciones en la maduración morfológica y funcional de las nuevas neuronas, y,

por otro lado, que también existía una insensibilidad a la modulación de la neurogénesis por estímulos tanto potenciadores (enriquecimiento ambiental) como inhibidores (estrés agudo) de este proceso [Pallas-Bazarra *et al.*, 2016]. Estos resultados sugieren un papel importante de la proteína tau en la regulación de la integración de estas neuronas en el circuito sináptico preexistente y en la modulación del proceso de neurogénesis adulta frente a estímulos modificadores.



**Figura 1–3: Etapas y marcadores en la neurogénesis hipocampal adulta.** Representación esquemática de las etapas del desarrollo de las nuevas neuronas a través de la capa de células granulares del giro dentado del hipocampo, comenzando desde las precursoras de tipo 1 (células de tipo glía radial) y células progenitoras de tipos 2 y 3 en la zona subgranular, y finalizando en las etapas posmitóticas hasta la obtención de neuronas maduras e integradas en la red sináptica hipocampal. Se incluyen algunos de los marcadores característicos de las distintas fases, con sus rangos aproximados de expresión temporal coloreados en azul (etapas proliferativas), verde (intermedias de diferenciación y migración) o rojo (maduración e integración sináptica de los neuroblastos): GFAP, BLBP, SOX2, fosfo-histona H3 (PH3), doblecortina (DCX), NeuN, tau, calretinina (Calr) y calbindina (Calb).

Las relación entre las alteraciones en la neurogénesis adulta y las enfermedades neurodegenerativas u otras patologías neurológicas no está clara a la luz de una bibliografía contradictoria en muchos casos, tanto en pacientes humanos como en modelo animales.

En algunos estudios se ha observado una disminución drástica en pacientes de AD, frente a un mantenimiento del proceso neurogénico en adultos sanos hasta edades muy avanzadas [Moreno-Jiménez *et al.*, 2019] (aunque otras publicaciones previas en personas sanas describieron una disminución de la neurogénesis adulta hasta alcanzar niveles indetectables a partir de la pubertad [Sorrells *et al.*, 2018]); sin embargo, otros trabajos encuentran precisamente la situación opuesta, con un incremento de DCX y de otros marcadores y factores asociados a neuronas en etapas proliferativas en la SGZ de enfermos de Alzheimer, argumentando una posible función de reemplazo de las pérdidas a causa de la patología [Jin, Peel *et al.*, 2004]. Por otro lado, se han descrito también aumentos en la neurogénesis adulta en pacientes de la enfermedad de Huntington [Curtis *et al.*, 2003], así como tras accidentes isquémicos, tanto en modelo animales como en humanos [Jin, X. Wang *et al.*, 2006].

Se han reportado reducciones en este proceso en modelos murinos triples transgénicos 3×Tg-AD, directamente correlacionadas con la presencia de placas de A $\beta$  en el hipocampo [Rodríguez *et al.*, 2008]; así mismo, la neurogénesis también se encontró disminuida en un modelo de ratón con el transgén de tau humana en un KO para la proteína endógena [Komuro *et al.*, 2015]. Además, algunos datos muestran que, en el modelo VLW triple mutante de FTDP-17, se produce una atrofia de la lámina ventral del giro dentado hipocam-pal, aparentemente a causa de una reducción en la proliferación de precursores neuronales en la neurogénesis adulta [Llorens-Martin, Hernandez *et al.*, 2011].

En otros modelos animales no se han encontrado diferencias significativas en la neurogénesis, ni a nivel de proliferación ni en supervivencia neuronal; es el caso, por ejemplo, del ratón tau-P301L [Boekhoorn *et al.*, 2006]. Finalmente, otros modelos murinos de AD han mostrado una amplificación de este proceso [Jin, Galvan *et al.*, 2004].

## 1.6 Fosfatasa alcalina no específica de tejido

La familia PP de fosfatasa con acción sobre la proteína tau descritas en la sección 1.2, como la mayoría de las que se han investigado en este ámbito, presentan actividad exclusivamente intracelular. Teniendo en cuenta la importancia creciente otorgada al papel de la proteína tau liberada al medio extracelular, y a la influencia que hemos visto de su estado de fosforilación en los procesos involucrados, resulta de gran relevancia el análisis de las enzimas de acción extracelular.

La exoenzima fosfatasa alcalina no específica de tejido (TNAP, *tissue-nonspecific alkaline phosphatase*) es una proteína codificada por el gen *ALPL* en humanos y por *Akp2* en ratones [Weiss *et al.*, 1988]; pertenece a la familia de fosfatasa alcalinas (AP), con número EC 3.1.3.1. En los seres humanos, la familia AP está compuesta por la TNAP, presente en todos los tejidos —aunque especialmente abundante en hígado, hueso y riñón—, y por isoenzimas placentarias, de células germinales e intestinales, siendo estas últimas codificadas por los genes *ALPP*, *ALPP2* y *ALPI* respectivamente [Millán, 2006].

La función de la TNAP se ha estudiado fundamentalmente en pacientes afectados por hipofosfatasia, una patología metabólica causada por mutaciones en el gen *ALPL*. La enfermedad presenta una acumulación de pirofosfato que actúa como inhibidor de la mineralización en huesos y dientes; otro efecto es una alteración en el metabolismo de la vitamina B6, que tiene como consecuencias, en los casos más graves, convulsiones epilépticas. Recientemente también se ha implicado a la TNAP en el metabolismo del ATP extracelular, en la producción de adenosina, y en la desfosforilación de las toxinas bacterianas conocidas como lipopolisacáridos, desempeñando por tanto una función importante en la inflamación; el papel de la TNAP en el mantenimiento de la relación ATP/adenosina es también relevante para la señalización purinérgica, pudiendo estos mecanismos regular el crecimiento axonal [Miras-Portugal *et al.*, 2017].

Finalmente, la capacidad de la TNAP para desfosforilar proteínas de la matriz extracelular ha llevado a la proposición de que esta enzima puede desempeñar un papel en la AD y en otras taupatías; de hecho, se ha descrito en enfermos de Alzheimer un aumento de la actividad enzimática de la TNAP, además de una correlación inversa entre esta y las funciones cognitivas [Vardy *et al.*, 2012]. Tras evidenciarse que dicha enzima puede desfosforilar tau en el medio extracelular [Díaz-Hernández *et al.*, 2015], y que esta proteína desfosforilada se comporta como un agonista de los receptores muscarínicos M1 y M3, pudiendo desencadenar la muerte de la neurona receptora [Díaz-Hernández *et al.*, 2010], este ciclo neurotóxico cobra un gran interés en el contexto de las taupatías.

Para estudiar las funciones de la TNAP se han utilizado principalmente ratones KO heterocigotos para su gen murino, es decir, con la mitad de carga proteica —haploinsuficientes— para esta enzima (*Akp2*<sup>+/-</sup>); esta elección es debida a que los KO homocigotos mueren a los pocos días del nacimiento [J. Liu *et al.*, 2014]. No obstante, los ratones *Akp2*<sup>-/-</sup> son un buen modelo de la forma más grave de hipofosfatasia; estos animales manifiestan, entre otros, problemas de crecimiento, mineralización anormal de los huesos, apnea, y problemas neurológicos graves entre los que se encuentran los ataques epilépticos; se da también un desarrollo aberrante de las raíces nerviosas lumbares, sugiriendo que el sistema nervioso autónomo también está comprometido. Estas manifestaciones en el sistema nervioso podrían ser una consecuencia de la falta de TNAP durante el desarrollo del tubo neural entre las etapas E8.5 y E13.5 de la embriogénesis [Narisawa *et al.*, 1997].

## 2 Objetivos

El modelo murino de taupatía PS19, que sobreexpresa bajo el promotor de *Prnp* la proteína tau humana con la mutación P301S de la FTDP-17, es uno de los modelos animales más utilizados en el campo de la enfermedad de Alzheimer y de otras taupatías; esto es debido a que presenta las principales marcas histopatológicas asociadas a la disfunción de la proteína tau en estas demencias, así como una evolución espacio-temporal de la aparición de los agregados de esta proteína, y de los daños asociados a estos, con ciertas semejanzas con la que tiene lugar en el cerebro de los pacientes de AD.

Sin embargo, algunos aspectos importantes del impacto que la sobreexpresión de dicha proteína tiene sobre el ratón son desconocidos; destacamos tres fundamentales: efecto sobre la neurogénesis adulta hipocampal, daños en el sistema nervioso periférico, y progresión de la patología asociada a tau a través de un mecanismo priónico.

Con estos antecedentes, los objetivos planteados para la presente tesis son:

1. Análisis de la neurogénesis adulta hipocampal en este modelo animal, incluyendo la expresión del transgén en las nuevas neuronas generadas, la tasa de producción neurogénica, y la morfología dendrítica de las nuevas neuronas una vez integradas en el circuito sináptico.
2. Análisis de los efectos neurodegenerativos sobre el sistema nervioso central (hipocampo) y el sistema nervioso periférico (nervio ciático), incluyendo sobreexpresión e hiperfosforilación de tau, gliosis, atrofia, degeneración axonal, muerte celular, y alteraciones en pruebas comportamentales y en la supervivencia.
3. Estudio del efecto que la fosfatasa extracelular TNAP tiene en la progresión de la taupatía, cruzando el modelo tau-P301S con un ratón haploinsuficiente para esta enzima y realizando los principales análisis anteriores en los grupos de genotipos resultantes.



### 3 Materiales y métodos

#### 3.1 Animales

El principal modelo murino que se ha empleado para la realización de esta tesis es el B6;C3-Tg(Prnp-MAPT\*P301S)PS19Vle/J [Yoshiyama *et al.*, 2007]; fue donado por Virginia M. Lee a The Jackson Laboratory, donde está disponible con número de *stock* 008169 [The Jackson Laboratory, 2019]. Esta línea PS19 incluye en hemigiosis la isoforma 1N4R (con un inserto N-terminal y cuatro dominios de unión a microtúbulos) del transgén de tau humano con la mutación P301S; el promotor es el del gen de la proteína priónica murina (*Prnp*). El fondo genético, B6C3F1, es híbrido de primera generación entre la línea C57BL/6 y la C3H; en nuestro laboratorio fue homogeneizado a C57BL/6J (generación F15 a la finalización de esta tesis), cruzando machos transgénicos hemigotos con hembras C57. En todos los grupos experimentales se emplearon los hermanos de camada para los controles silvestres (WT), y se mantuvieron proporciones de sexos equilibradas. Nos referiremos a los ratones con este transgén como «P301S».

Los animales fueron mantenidos en el animalario del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, CBMSO (UAM-CSIC; Madrid, España), con 5-6 animales por jaula, y con comida y agua disponibles *ad libitum*; en la sala se efectúa un ciclo de luz/oscuridad de 12/12 horas, con una temperatura de  $22 \pm 1$  °C. Todos los procedimientos efectuados sobre los animales fueron aprobados por la Comisión de Bioética del CBMSO; se siguieron las directrices del Convenio ETS 123 del Consejo de Europa, recientemente revisado según se indica en la Directiva 86/609/EEC.

Adicionalmente, en colaboración con el laboratorio del Prof. Miguel Díaz Hernández de la Universidad Complutense de Madrid (UCM), se emplearon animales haploinsuficientes de la TNAP. Dicha línea, también con fondo genético C57BL/6J, es *knockout* (KO) de una de las copias del gen que codifica esta fosfatasa en ratones: *Akp2*<sup>+/-</sup>; el modelo KO de *Akp2* fue cedido amablemente por el Prof. José Luis Millán, del Instituto de Investigación Médica Sanford Burnham (La Jolla, California, EE. UU.) [Narisawa *et al.*, 1997]. Nos referiremos a los ratones haploinsuficientes de esta proteína como «Akp2».

Esta línea fue cruzada con nuestra línea de ratones P301S para obtener grupos con las cuatro posibles combinaciones de genotipos: WT, Akp2, P301S y Akp2/P301S. Estos animales fueron mantenidos en las mismas condiciones previamente detalladas en el animalario de la Facultad de Medicina de la UCM.

#### 3.2 Genotipado por PCR

Para la determinación del genotipo de los ratones en la línea P301S se empleó el procedimiento de la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) [Mullis y Faloona, 1987] sobre puntas de unos 2-3 mm de las colas de los ratones.

Inicialmente, el tejido se digirió empleando 150  $\mu$ l de NaOH 50 mM a 100 °C en agitación durante 1 hora. A continuación, la reacción se neutralizó añadiendo 15  $\mu$ l de Tris-HCl 1 M (pH 8); el *pellet* sin digerir se precipitó con una centrifugación a 18 400 *g* durante 10 minutos.

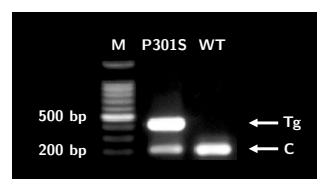
Se añadieron 2  $\mu$ l del sobrenadante de la digestión de las muestras a la mezcla de reacción (10  $\mu$ l por pocillo), elaborada con el kit de Promega GoTaq G2 Flexi DNA Polymerase y la mezcla de dNTP 100  $\mu$ M de Invitrogen (Thermo Fisher Scientific). La composición de la mezcla por pocillo es la siguiente: 2,4  $\mu$ l de tampón verde 5 $\times$ ; 0,96  $\mu$ l de MgCl 25 mM; 0,48  $\mu$ l de mezcla de dNTP diluida a 5 mM; 0,3  $\mu$ l de cada uno de los cuatro oligonucleótidos a 20  $\mu$ M; 0,1  $\mu$ l de polimerasa *Taq* (5 U/ $\mu$ l); 4,86  $\mu$ l de agua destilada Milli-Q.

Los cuatro oligonucleótidos empleados como cebadores amplifican una región del transgén (para identificar a los ratones hemicigotos P301S), de unos 450 bp, y otra región de un gen murino, de unos 200 bp, que actúa como control positivo. Los oligonucleótidos fueron encargados a Sigma-Aldrich (Merck) a partir de las secuencias ofrecidas por The Jackson Laboratory. En la tabla 3–1 se detallan las secuencias de dichos oligonucleótidos, además de presentarse una figura representativa de las bandas de las regiones amplificadas en la electroforesis final.

El protocolo de PCR, adaptado del proporcionado por The Jackson Laboratory, consistió en 2 bloques de amplificación tras un tiempo inicial de 3 minutos a 94 °C. El primer bloque constó de 11 ciclos (94 °C, 15 s)-(72 °C, 25 s). El segundo bloque, de 29 ciclos (94 °C, 15 s)-(65 °C, 15 s)-(72 °C, 10 s). Finalmente, un tiempo de 10 segundos a 72 °C, y espera a 4 °C.

Los productos de PCR se corrieron en geles de agarosa al 1 % con SYBR Safe de Invitrogen (Thermo Fisher Scientific) para la visualización del DNA. El marcador de peso molecular empleado fue el 100 bp Ladder de VWR Chemicals (Avantor).

Tg	S	GGCATCTCAGCAATGTCTCC
	A	GGTATTAGCCTATGGGGACAC
C	S	CAAAATGTTGCTTGTCTGGTG
	A	GTCAGTCGAGTGCACAGTTT



**Tabla 3–1: Oligonucleótidos y PCR para el genotipado.** A la izquierda, las secuencias sentido (S) y antisentido (A) de los oligonucleótidos empleados como cebadores en la PCR para el genotipado de la línea P301S; se amplifican dos fragmentos: transgén (Tg) y banda control (C). A la derecha, resultado de la PCR con las bandas correspondientes en un ratón P301S y un ratón WT, frente a un marcador de peso molecular (M); los fragmentos amplificados tienen un tamaño aproximado de 450 bp (Tg) y 200 bp (C).

### 3.3 Inyección estereotáxica de retrovirus

Para el estudio de la morfología dendrítica en la neurogénesis adulta se empleó un retrovirus —solo infecta a células en división— PSD95:GFP, codificando para la fusión de las proteínas PSD95 (proteína 95 de la densidad postsináptica) y GFP (proteína fluorescente

verde); fue cedido amablemente por el Prof. Carlos Lois, del Caltech (Pasadena, California, EE. UU.) [Kelsch *et al.*, 2008].

Se utilizó el marcado de la proteína GFP mediado por un anticuerpo primario y uno secundario fluorescente (Alexa 555, en el canal rojo), combinado con la propia autofluorescencia de dicha proteína (en el canal verde); esta última señal es especialmente intensa en las espinas dendríticas, dado que el lugar de reclutamiento de la proteína PSD95 es la densidad postsináptica. De este modo, el árbol dendrítico se puede estudiar en el canal rojo, y, la morfología de las espinas dendríticas, en el verde de manera simultánea.

La producción de los virus fue realizada mediante la transfección en placas P100 de células 293T con 5 µg del plásmido a empaquetar, empleando los reactivos Lipofectamine y Lipofectamine Plus (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific). A las 24 horas se cambió el medio, añadiendo 5 ml de medio fresco (DMEM 10 %). Tras 24 horas, se filtró el medio con un tamaño de poro de 0,45 µm; a continuación, las partículas víricas fueron concentradas mediante centrifugación a 85 200 *g* durante 2 horas a 4 °C. Finalmente, se resuspendió el *pellet* en tampón fosfato salino (PBS) 1× y se tituló. Los retrovirus producidos mediante este protocolo tuvieron un título de 10<sup>6</sup>-10<sup>7</sup> PFU/ml; fueron conservados congelados a -80 °C hasta su uso.

Para la inoculación, los animales se mantuvieron anestesiados mediante un flujo continuo de oxígeno de 1 l/min con isoflurano al 2-3 %. Tras su fijación en la montura estereotáxica (Stoelting) con el cráneo horizontal, se procedió a abrir la piel de la cabeza con un bisturí estéril; mediante un bastoncillo humedecido en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 5 % se desinfectó la superficie del cráneo y se facilitó la visualización del punto bregma. Gracias a una aguja de punta roma, se realizó la perforación sobre el punto de inyección en ambos hemisferios. La inoculación se realizó mediante una micropipeta de vidrio de 1,65/1,1 mm de diámetro externo/interno, fabricada con la ayuda de un *puller* (World Precision Instruments); la micropipeta se conectó a una jeringuilla Hamilton mediante un sistema de tubos de polietileno de 1,09/0,38 mm de diámetro externo/interno (Stoelting). Se procedió al descenso de la punta de la micropipeta hasta el punto de inoculación en el DG de cada hemisferio; las coordenadas con respecto a bregma fueron (mm): -2 (anteroposterior); -1,4 (mediolateral); -2,2 (dorsoventral). Se inyectó un volumen de retrovirus de 2 µl en cada hemisferio, con un flujo de 0,2 µl/min mantenido gracias a una bomba de inyección de precisión (Stoelting).

Tras la inoculación, la micropipeta se mantuvo en posición durante 2 minutos para evitar el reflujo; a continuación, se procedió a su retirada lentamente durante 3 minutos. Tras finalizar ambas inoculaciones, la piel se suturó con grapas Reflex (Stoelting) de 7 mm; los animales se mantuvieron aislados durante 15 minutos tras la retirada de la anestesia.

Los animales fueron inoculados con 8 semanas de edad; es necesaria una edad temprana para que la neurogénesis elevada garantice un número suficiente de células infectadas para los análisis estadísticos. Estos ratones fueron sacrificados transcurridas otras 8 semanas, tiempo requerido para que las nuevas neuronas se integren en los circuitos hipocampales.

### 3.4 Pruebas de comportamiento

#### 3.4.1 Rotarod

La prueba del rotarod fue realizada con un grupo de ratones a las edades de 8; 8,5 y 9 meses. El aparato (Ugo Basile) consiste en una barra giratoria, a velocidad constante o en aceleración, sobre la que se coloca a los ratones en carriles individuales; se evalúa la coordinación motora y la función locomotora midiendo el tiempo que logre permanecer el ratón caminando sobre la barra. Se comienza con un período de entrenamiento de 2 días: el primer día, 4rpm durante 1 min, 4 repeticiones; el segundo día, 4-8rpm durante 2 min, 4 repeticiones. En el tercer día, el rotarod acelera de 4 a 40 rpm durante 5 min, también con 4 repeticiones; se mide la latencia media hasta la caída. En las repeticiones de la prueba sobre los mismos ratones solo se requiere el segundo día de entrenamiento antes del día de la prueba cronometrada.

#### 3.4.2 Campo abierto y preferencia de nueva posición

Las pruebas de campo abierto (OF, *open field*) y preferencia de nueva posición (NLP, *novel-location preference*) se realizaron sobre un grupo de ratones de 9,5 meses de edad. El aparato consiste en una caja de metacrilato transparente con base cuadrada de 45 × 45 cm; los ratones tienen una sesión diaria de 10 minutos a lo largo de tres días consecutivos con la siguiente configuración:

- Día 1: caja vacía; prueba de OF.
- Día 2: dos piezas de ajedrez iguales se colocan simétricamente en el centro de la caja.
- Día 3: una de las piezas es movida a una posición más periférica, mientras la otra permanece en su localización original.

La prueba de OF nos permite evaluar en los ratones dos grupos de conductas relacionados. El primero, el relativo a la actividad motora y exploratoria; se calculan la distancia total recorrida y la velocidad media durante la sesión. El segundo involucra los niveles de ansiedad: se mide el número de entradas a la zona central, indicador inversamente proporcional al estado ansioso del animal (la periferia les ofrece mayor protección). Las medidas obtenidas a partir de la evaluación de la actividad motora y los niveles de ansiedad están estrechamente relacionadas con la función hipocampal [Snyder *et al.*, 2009].

La prueba de NLP valora la capacidad de distinguir dos contextos muy similares, generando un patrón de actividad neuronal distinto para cada uno (*pattern separation*); esta facultad ha sido relacionada con la neurogénesis adulta que tiene lugar en el hipocampo [Deng *et al.*, 2010] [Sahay *et al.*, 2011] [Aimone *et al.*, 2011]. Se evalúa la capacidad de reconocer el cambio de posición de la pieza de ajedrez a través del índice de reconocimiento: porcentaje

de exploraciones (aproximaciones con el hocico) del objeto movido con respecto al total de exploraciones de las dos piezas. Adicionalmente, también hemos cuantificado el número total de exploraciones sobre ambas piezas en el día 3.

### 3.4.3 Laberinto acuático de Morris

El laberinto acuático de Morris (MWM, *Morris water maze*) se realizó sobre un grupo de ratones de 5,5 meses de edad. La prueba consiste en una piscina de 150 cm de diámetro y unos 60 cm de profundidad, llena hasta la mitad con agua opaca gracias a dióxido de titanio en suspensión; se establecen cuatro cuadrantes con pistas visuales —figuras geométricas— en las paredes de la piscina, a la vista de los ratones durante la prueba. En uno de los cuadrantes se coloca una plataforma —con una superficie de  $10 \times 10$  cm— sumergida lo suficiente como para que sea invisible pero el ratón haga pie al pasar por ella; como el agua se mantiene a unos  $21^\circ\text{C}$ , resulta un estímulo desagradable y el ratón nadará hasta encontrar la plataforma. Se establecen 5 días consecutivos de entrenamiento, y un día de prueba final (llamada prueba de la sonda) a continuación:

- En los días de entrenamiento, se realizan cuatro rondas en las que se libera al ratón en cada uno de los cuadrantes (el orden del cuadrante de liberación que sigue el grupo es aleatorio cada día); cada ejercicio, cronometrado, finaliza cuando el ratón encuentra la plataforma, o al cumplirse un máximo de 1 minuto nadando (en este caso, se guía al ratón hasta la plataforma). Se deja que el ratón permanezca unos 10 s en la plataforma antes de sacarlo y secarlo con una toalla. Se calcula la latencia media diaria en encontrar la plataforma, evaluando de este modo la progresión del aprendizaje espacial del cuadrante donde está localizada de acuerdo a las pistas visuales proporcionadas (pero independientemente de la posición de partida del animal).
- El día de la prueba de la sonda, se quita la plataforma y se estudia el comportamiento del ratón durante 1 minuto en una única ronda, sacándolo del agua y secándolo a continuación. Se calcula el porcentaje medio de tiempo que permanece nadando en el cuadrante donde estaba la plataforma, evaluando de este modo la memoria espacial.

La prueba del MWM está ampliamente reconocida como un buen indicador de la navegación espacial y memoria de referencia dependientes del hipocampo [Morris, 1983] [Vorhees y Williams, 2006].

## 3.5 Sacrificio y preparación inicial de muestras

Los animales fueron anestesiados mediante una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (Dolethal, Vetoquinol), 60 mg/kg de peso del ratón; a continuación, se los perfundió intracardiácamente con 50 ml de salino al 0,9 %; adicionalmente para aquellos grupos

destinados únicamente a inmunofluorescencia (IF) o inmunohistoquímica (IH), se perfundió a continuación con 50 ml de una solución fijadora de paraformaldehído (PFA; Electron Microscopy Science) al 4 % en tampón fosfato (PB) 0,1 N.

Tras perfundir al animal, se procedió a extraer el cerebro y separar ambos hemisferios con una cuchilla. En aquellos casos en los que se requirió su análisis, el nervio ciático fue retirado tras exponerlo sosteniendo ambas patas traseras con una mano y tirando de la cola en la dirección opuesta, siguiendo el procedimiento descrito en la bibliografía [Bala *et al.*, 2014].

Los hemisferios destinados a técnicas bioquímicas como *western blot* (WB) o proteómica fueron diseccionados y, junto con los nervios ciáticos con ese mismo destino, congelados inmediatamente en nitrógeno líquido y conservados a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

Los hemisferios y nervios ciáticos destinados a IF o IH se dejaron sumergidos en PFA al 4 % en PB 0,1 N, a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 24 h.

Los hemisferios y nervios ciáticos destinados a microscopía electrónica se dejaron sumergidos en una solución fijadora de glutaraldehído al 2 % y PFA al 4 % en PB 0,1 N, a temperatura ambiente durante 2 h.

### 3.6 Western blot

Tanto los hipocampos como los nervios ciáticos fueron homogeneizados en hielo en un tampón de composición HEPES 20 mM (pH 7,4), NaCl 100 mM, NaF 50 mM, EDTA 5 mM, Triton X-100 1 %, más una mezcla de inhibidores de fosfatasas (ortovanadato 5 mM, glicerofofato 0,1 M, pirofosfato 10 mM y ácido okadaico  $1\text{ }\mu\text{M}$ ) y una mezcla de inhibidores de proteasas COMPLETE (Roche).

A continuación, se determinó la concentración proteica del sobrenadante tras centrifugación a  $10\,000\text{ }g$  mediante el método de Bradford [M. M. Bradford, 1976].

Dichos extractos proteicos se hirvieron durante 5 minutos en tampón de carga de electroforesis, siendo sometidos a continuación a una electroforesis estándar SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 10 % (carga de  $15\text{ }\mu\text{g}$  de proteína total por carril), junto a un marcador de peso molecular BenchMark Pre-Stained Protein Ladder de Invitrogen (Thermo Fisher Scientific). Posteriormente, fueron electrotransferidos a una membrana de nitrocelulosa (Schleicher & Schuell BioScience) utilizando el sistema Mini-PROTEAN de Bio-Rad (150 mA durante 45 minutos) [Bio-Rad, 2019]. Para comprobar el resultado de la transferencia, la membrana se tiñó con rojo Ponceau.

Tras un bloqueo con leche en polvo desnatada al 5 % en PBS-Tween 20 (0,1 %) durante 45 minutos, la membrana se incubó con los anticuerpos primarios diluidos en solución de bloqueo, a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 24 h (para más información sobre los anticuerpos, ver la sección 3.12).

Al día siguiente, tras tres lavados con PBS-Tween 20, se aplicó el anticuerpo secundario durante 45 minutos; a continuación, se realizaron cuatro lavados finales con PBS-Tween 20,

y se reveló mediante Western Lightning Plus-ECL (PerkinElmer) sobre películas Agfa Curix RP2-Plus. Finalmente, las películas fueron escaneadas a 16 bits en un densitómetro Bio-Rad GS-900.

### 3.7 Proteómica

Los hipocampos fueron homogeneizados y sometidos a LC-MS/MS (cromatografía líquida con espectrometrías de masas en tándem) por el Servicio de Proteómica del CBMSO. La base de datos empleada para la identificación de los péptidos fue UniProt.

### 3.8 Técnicas histológicas

En el caso de las técnicas histológicas ópticas (IF e IH), tanto los hemisferios cerebrales como los nervios ciáticos se incluyeron en agarosa al 4 % y sacarosa al 10 % en PB 0,1 N. Las secciones, con un grosor de 50  $\mu\text{m}$ , se obtuvieron en un vibratomo Leica VT1000S del Servicio de Microscopía Óptica y Confocal del CBMSO; se realizaron cortes sagitales en el caso de los cerebros, y tanto transversales como longitudinales para los nervios ciáticos. Las muestras se conservaron a  $-20^\circ\text{C}$  en una solución crioprotectora compuesta por etilenglicol al 30 % y glicerol al 26 % en tampón fosfato 0,1 N.

En el caso de la microscopía electrónica, tanto los hemisferios cerebrales como los nervios ciáticos fueron procesados por el Servicio de Microscopía Electrónica del CBMSO. Fueron fijados nuevamente con tetróxido de osmio al 1 % en agua, a  $4^\circ\text{C}$  durante 1 h; a continuación, fueron deshidratados con etanol y embebidos en resina epoxi TAAB 812. Se obtuvieron secciones ultrafinas de 80 nm con un ultramicrotomo Leica Ultracut E; los cortes fueron montados sobre rejillas de cobre recubiertas con carbono.

#### 3.8.1 Inmunofluorescencia

Las secciones fueron sometidas a un proceso de inmunomarcado en flotación (ver los detalles sobre los anticuerpos y marcadores utilizados en la sección 3.12).

Después de tres lavados con PB 0,1 N, los cortes fueron incubados a  $4^\circ\text{C}$  durante 72 h con los anticuerpos primarios en la solución de bloqueo (BSA al 1 % y Triton X-100 al 1 % en PB 0,1 N).

A continuación, se realizaron cinco lavados con la solución de bloqueo, dejando las secciones incubando con los anticuerpos secundarios en la misma solución, a  $4^\circ\text{C}$  durante 24 h.

Finalmente, se realizaron tres lavados con PB 0,1 N, marcado con DAPI (diluido también en PB 0,1 N) durante 10 minutos, otros tres lavados con PB 0,1 N, y montaje final empleando FluorSave (Calbiochem, Merck Millipore).

Las imágenes fueron obtenidas en las instalaciones del Servicio de Microscopía Óptica y Confocal del CBMSO. Para las cuantificaciones a partir de fotografías, y para la toma de



las imágenes representativas, se empleó un microscopio de barrido láser confocal y multifotón LSM710 acoplado a un microscopio invertido AxioObserver (Zeiss). Las cuantificaciones directas se realizaron a través del objetivo 40× de un microscopio de fluorescencia vertical Axioskop 2 Plus (Zeiss).

### 3.8.2 Inmunohistoquímica

Para los distintos anticuerpos (ver los detalles en la sección 3.12), las secciones fueron sometidas en flotación a un proceso de inmunoprecipitación de 3,3'-diaminobencidina (DAB); se empleó el kit VECTASTAIN Elite ABC (Vector Laboratories), siguiendo el protocolo marcado por el fabricante [Vector Labs, 2019].

Tras tres lavados con PB 0,1 N, se procedió a la inactivación de la peroxidasa endógena durante 40 minutos con una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3 % en metanol.

Después de cinco lavados con solución de bloqueo (BSA al 1 % y Triton X-100 al 1 % en PB 0,1 N), los cortes se incubaron 24 h a 4 °C con los anticuerpos primarios en dicha solución.

Al día siguiente se realizaron, con la misma solución de bloqueo, los siguientes pasos: cinco lavados; incubación con el anticuerpo biotinilado del kit durante dos horas; cinco lavados; incubación con el complejo avidina-biotina-peroxidasa del kit durante una hora.

Tras tres lavados con PB 0,1 N, se procedió al revelado con una pastilla de DAB y una de urea de SIGMAFAST (Sigma-Aldrich, Merck), preparadas en 10 ml del mismo tampón y filtradas con un tamaño de poro de 0,22 µm (Merck Millipore). El revelado se detuvo con agua destilada a los 10 minutos, montando finalmente empleando FluorSave (Calbiochem, Merck Millipore).

Las imágenes fueron obtenidas en un microscopio de luz transmitida Olympus BX41 con una cámara CCD Olympus ColorView IIIu acoplada, cedidos amablemente por el Prof. José Javier Lucas. Las cuantificaciones directas fueron realizadas en este mismo microscopio a través del objetivo 40×.

### 3.8.3 Microscopía electrónica

Los cortes montados sobre las rejillas fueron teñidos con acetato de uranilo y citrato de plomo. Se empleó un microscopio electrónico JEOL JEM 1010 (a 80 kV) del Servicio de Microscopía Electrónica del CBMSO; las imágenes fueron capturadas con una cámara CMOS TemCam F416 (TVIPS).

## 3.9 Cuantificaciones histológicas

Todos los recuentos celulares se realizaron directamente a través del microscopio en el grosor completo de las secciones (50 µm). Para aquellos localizados en la SGZ o la formación hipocampal se cubrió el total de dichas estructuras en cada corte examinado. Para el análisis



de células positivas para el anticuerpo AT8 contra tau hiperfosforilado en CA1 se recorrió la longitud total abarcada por esta región en el campo de visión con la configuración establecida para el microscopio (350  $\mu\text{m}$ ); se calculó el volumen muestreado a partir de este valor, el grosor del corte y la altura medida de CA1 en cada sección. Los cálculos de la superficie de la SGZ para la neurogénesis adulta se realizaron a partir del perímetro de esta región y el grosor del corte.

Para los análisis del porcentaje de área cubierta en el caso de los estudios de astrogliosis (anticuerpo contra GFAP) y microgliosis (anticuerpo contra Iba1) se calculó la media en cada ratón a partir de fotografías de tres campos con el objetivo 40 $\times$  en sendos cortes. La forma de obtener el porcentaje de área ocupada en cada imagen fue la siguiente: resta de la señal de fondo en escala de grises (8 bits); establecimiento del umbral de señal a considerar, común a todo el análisis, de tal forma que se contorneen las células en foco sin tener en cuenta las del fondo no enfocado; y medición de la fracción de área ocupada según este protocolo. Para el cálculo del porcentaje de ratones con microglía activada, a partir de las mismas imágenes que en la cuantificación de área ocupada por células positivas para Iba1, se consideró que un ratón era positivo para microglía con morfología reactiva —ameboide o en bastón— si esta era mayoritaria en alguno de los tres campos fotografiados.

Los cálculos del volumen completo de la GCL hipocampal se realizaron a partir de las áreas medidas en series completas de cortes sagitales cubriendo todo el eje mediolateral del cerebro, separados 400  $\mu\text{m}$  (8 cortes) entre ellos; el total de secciones por cada serie obtenida de esta manera fue de 8-10.

El estudio de la morfología dendrítica mediante retrovirus se llevó a cabo sobre una serie completa (con las características mencionadas previamente) de cada hemisferio, recopilando el total de neuronas por genotipo. Para realizar un muestreo preciso que permitiese la reconstrucción de todo el árbol dendrítico, se efectuaron fotografías con el objetivo 40 $\times$  y un apilado (*stacking*) de planos en Z con una separación entre estos de 0,5  $\mu\text{m}$ ; las imágenes representativas mostradas son proyecciones en Z de dichos planos.

En el caso del análisis por microscopía electrónica, todas las cuantificaciones presentadas se obtuvieron a partir de tres campos fotografiados a 800 $\times$  (escogidos aleatoriamente de un total de cinco) por animal: se seleccionaron todos los axones mielinizados en corte transversal que aparecieran lo suficientemente completos; los porcentajes de axones degenerados fueron obtenidos directamente a partir de esta primera criba. Para la distribución de axones según el calibre y para el cálculo del diámetro interior medio, se filtraron solo las fibras no degeneradas y, de estas, se escogió aleatoriamente un conjunto de 15 axones por campo para realizar el resto de mediciones.

El resto de cuantificaciones sobre secciones histológicas, incluyendo el estudio de expresión del transgén en la neurogénesis adulta, se realizó sobre un mínimo de 3 y un máximo de 6 cortes para establecer la media de cada animal; se emplearon siempre secciones equivalentes con coordenadas intermedias en el eje mediolateral.

### 3.10 Análisis estadístico

En todos los casos se asumió la distribución normal de los datos, que fue verificada posteriormente a través de las pruebas de D'Agostino-Pearson, Shapiro-Wilk y Kolmogorov-Smirnov (según el tamaño de las muestras).

En las comparaciones de los valores medios de dos grupos se empleó la prueba paramétrica  $t$  de Student, con datos no apareados y valor  $p$  de dos colas; cuando la comparación implicaba más de dos grupos, se aplicó la prueba de análisis de la varianza (ANOVA), que fue en todos los casos de una vía y datos no apareados. Para verificar la igualdad de varianzas, se utilizó la prueba  $F$  para la  $t$  de Student, y las pruebas de Brown-Forsythe y de Bartlett para el ANOVA. Las comparaciones *post hoc* dos a dos en el ANOVA se realizaron bien con respecto al grupo control WT, bien en otras combinaciones, mostrando los valores  $p$  corregidos para la multiplicidad mediante la prueba de Dunnett o la de Tukey, respectivamente.

Para el análisis de Sholl se realizó una prueba  $t$  de Student independiente en cada punto de suma parcial de intersecciones. De modo equivalente se procedió en las tres pruebas de rotarod, con sendos ANOVA independientes, corregidos para la multiplicidad interna a cada análisis tal y como ya se ha descrito.

Para la comparación de las curvas de aprendizaje en la prueba del laberinto acuático de Morris, se optó por emplear el área bajo la curva (entre las curvas de aprendizaje y el eje de abscisas) por considerarla la variable unidimensional que mejor resume el aprendizaje global de cada ratón a lo largo de los cinco días de entrenamiento. Las áreas medias de cada genotipo se compararon a continuación mediante una prueba  $t$  de Student siguiendo las directrices especificadas previamente en este apartado.

Para el análisis de supervivencia se llevó a cabo una comparación Kaplan-Meier de las curvas de supervivencia (prueba de Mantel-Cox o *logrank*).

Para el análisis de variables dependientes cualitativas dicotómicas, como son la clasificación de las neuronas en forma de «V» o en «Y», de los ratones con o sin microglía activada, y de los axones degenerados o normales, se aplicó la prueba exacta de Fisher (equivalente a la prueba  $\chi^2$  de Pearson, pero más robusta para muestras pequeñas) a las tablas de contingencia elaboradas con estos datos; en el caso de variables dependientes de más de dos categorías, como la clasificación de los calibres axonales en cuatro rangos de diámetro interior, fue utilizada la prueba de independencia  $\chi^2$  de Pearson. Para aquellos análisis entre más de dos grupos, se muestran los valores  $p$  corregidos para la multiplicidad mediante el método de Bonferroni. En los diagramas de variables dependientes cualitativas donde sea interesante su representación, los intervalos de confianza, calculados mediante el método de Wilson/Brown, se trazan por encima y por debajo de la barra que representa la proporción, dado que son asimétricos.

En cada resultado estadístico en esta tesis se reflejan las diferencias significativas que existan con respecto al grupo WT con el correspondiente símbolo (según la significación)

sobre cada grupo comparado con dicho control; para comparaciones entre otras parejas, o cuando se precise mayor claridad, estas se muestran con llaves entre los grupos implicados.

El resto de detalles estadísticos no comentados aquí, como las relativos a los análisis de regresión lineal, están ya íntimamente relacionados con los datos que se manejan en cada caso, y son descritos en sus correspondientes resultados. En los pies de cada figura se detallan el tamaño de las muestras ( $n$ ), la naturaleza de los datos representados, y la leyenda para los niveles de significación que correspondan.

### 3.11 Software

Las imágenes de microscopía confocal se tomaron a través del software ZEN (Zeiss); las imágenes de microscopía de luz transmitida, a través del programa cellSens Entry (Olympus); las de microscopía electrónica, con el software EMMENU (Tietz). Todas las imágenes fueron analizadas y cuantificadas mediante ImageJ/Fiji [Schindelin *et al.*, 2012]; para el estudio de la morfología dendrítica se emplearon las herramientas para ImageJ Sholl Analysis [Ferreira *et al.*, 2014] y NeuronJ [Meijering *et al.*, 2004]. Para algunos de los análisis de las pruebas de comportamiento de OF-NLP se utilizó el programa ANY-maze (Stoelting) sobre los vídeos grabados.

Para el análisis inicial de los datos se empleó Microsoft Excel; el análisis estadístico y las gráficas resultantes se obtuvieron mediante el software GraphPad Prism. Para los dibujos vectoriales se empleó Microsoft PowerPoint con la librería SMART [Servier, 2019]. El editado y el montaje de las figuras se realizaron a través de Adobe Photoshop y Adobe Illustrator.

Esta memoria fue escrita en lenguaje  $\text{\LaTeX}$  con *hyperref*: en el PDF los enlaces son interactivos, tanto los internos (índice, referencias bibliográficas, secciones y tablas/figuras) como los hiperenlaces (URL y DOI).

### 3.12 Reactivos comunes y anticuerpos

Todos los reactivos comunes que se utilizaron, si no se indica lo contrario, proceden de las casas comerciales Sigma-Aldrich (Merck) y Boehringer Mannheim (Roche).

En la tabla 3-2 aparecen detallados todos los anticuerpos primarios empleados en los experimentos de IF, IH y WB. Veamos a continuación el resto de anticuerpos y marcadores utilizados, junto a sus respectivas diluciones:

- IF: anticuerpos secundarios producidos en burro, conjugados con fluoróforos Alexa 488, 555 y 647: 1/2000 (Thermo Fisher Scientific); DAPI: 1/5000 (Merck Millipore).
- IH: anticuerpos secundarios producidos en caballo, biotinilados, incluidos dentro de los kits VECTASTAIN Elite ABC: 1/250 (Vector Laboratories) [Vector Labs, 2019].
- WB: anticuerpos secundarios producidos en cabra, conjugados con HRP (*horseradish peroxidase*, peroxidasa de rábano): 1/2000 (Dako).

Nombre	Proteína/epítipo	Animal	Fabricante (n.º cat.)	Dilución
<b>Anti-BLBP</b>	BLBP	Conejo p.	Abcam (ab32423)	1/400 (IF)
<b>Anti-C-Casp-3</b>	Casp-3 cortada (Asp175)	Conejo p.	Cell Signaling (9661)	1/100 (IH)
<b>Anti-Calb</b>	Calb D-28k	Conejo p.	Swant (CB38)	1/1000 (IF)
<b>Anti-Calr</b>	Calr	Conejo p.	Swant (7697)	1/200 (IF/IH)
<b>Anti-DCX</b>	DCX (C-terminal)	Cabra p.	Santa Cruz (sc-8066)	1/500 (IF/IH)
<b>Anti-GAPDH</b>	GAPDH	Ratón m.	Abcam (ab8245)	1/5000 (WB)
<b>Anti-GFAP</b>	GFAP	Conejo p.	Promega (G5601)	1/1000 (IH)
<b>Anti-GFP</b>	GFP	Conejo p.	Thermo Fisher (A-11122)	1/1000 (IF)
<b>Anti-Iba1</b>	Iba1	Conejo p.	Wako (019-19741)	1/500 (IH)
<b>Anti-PH3</b>	PH3 (Ser10)	Conejo p.	Merck Millipore (06-570)	1/250 (IF)
<b>Anti-tau AT8</b>	P-tau (Ser202/Thr205)	Ratón m.	Thermo Fisher (MN1020)	1/100 (IF/IH) 1/100 (WB)
<b>Anti-tau HT7</b>	Tau (humano)	Ratón m.	Thermo Fisher (MN1000)	1/200 (IF/IH) 1/1000 (WB)
<b>Anti-tau TAU-5</b>	Tau	Ratón m.	Merck Millipore (577801)	1/1000 (WB)

**Tabla 3–2: Anticuerpos primarios empleados.** Se detallan las proteínas o epítipos reconocidos, el animal en el que fueron producidos —y si son monoclonales (m.) o policlonales (p.)—, además de las diluciones empleadas en las técnicas de inmunofluorescencia (IF), inmunohistoquímica (IH) y/o *western blot* (WB).

## 4 Resultados

### 4.1 Expresión del transgén en el ratón P301S

De acuerdo a la caracterización inicial del ratón P301S que realizó el grupo responsable de su generación [Yoshiyama *et al.*, 2007], y una amplia bibliografía acumulada en los años posteriores, este modelo transgénico sobreexpresa en el sistema nervioso central el transgén de la proteína tau humana P301S (aproximadamente 5 veces la cantidad de tau endógena), que además se encuentra hiperfosforilada.

La expresión de *Prnp*, bajo cuyo promotor se expresa tau-P301S, ha sido descrita en distintos órganos y tejidos, siendo especialmente alta en CNS y PNS [Bendheim *et al.*, 1992] [Wulf *et al.*, 2017]. Con respecto a los tipos celulares del sistema nervioso que expresan esta proteína, los resultados son contradictorios y controvertidos; algunas publicaciones sostienen que la expresión es fundamentalmente neuronal, con niveles indetectables en glía [Ford *et al.*, 2002] [Moya *et al.*, 2005] [Steele *et al.*, 2006], mientras otras sí describen la expresión de *Prnp* en células gliales [Moser *et al.*, 1995], y específicamente en glía mielinizante del CNS [Mironov *et al.*, 2003] o del PNS [B. M. Bradford *et al.*, 2009].

Con la literatura mencionada, y teniendo en cuenta la parálisis y la atrofia muscular (principalmente en las patas traseras) propias de este modelo [Scattoni *et al.*, 2010] [Xu *et al.*, 2014], nos propusimos comprobar la expresión y fosforilación de tau-P301S tanto en el CNS (centrando nuestro estudio en el hipocampo) como en el PNS (nervio ciático) de nuestros animales. El fondo genético en nuestro caso, al contrario que el híbrido B6C3F1 del original de Lee, puede considerarse C57BL/6J puro por los cruzamientos sucesivos desde el establecimiento de la colonia en nuestro animalario. Con respecto a la expresión del transgén durante la neurogénesis adulta, nuestros resultados pueden consultarse en la sección 4.4.1.

Finalmente, se realizó un estudio de proteómica de los péptidos de tau presentes en el CNS (hipocampo), con el objetivo principal de comprobar si la proteína transgénica se encuentra fosforilada en el aminoácido mutado, la serina 301, dato que no aparece en la bibliografía.

#### 4.1.1 El ratón P301S sobreexpresa la proteína tau-P301S, que se encuentra hiperfosforilada, en el sistema nervioso central

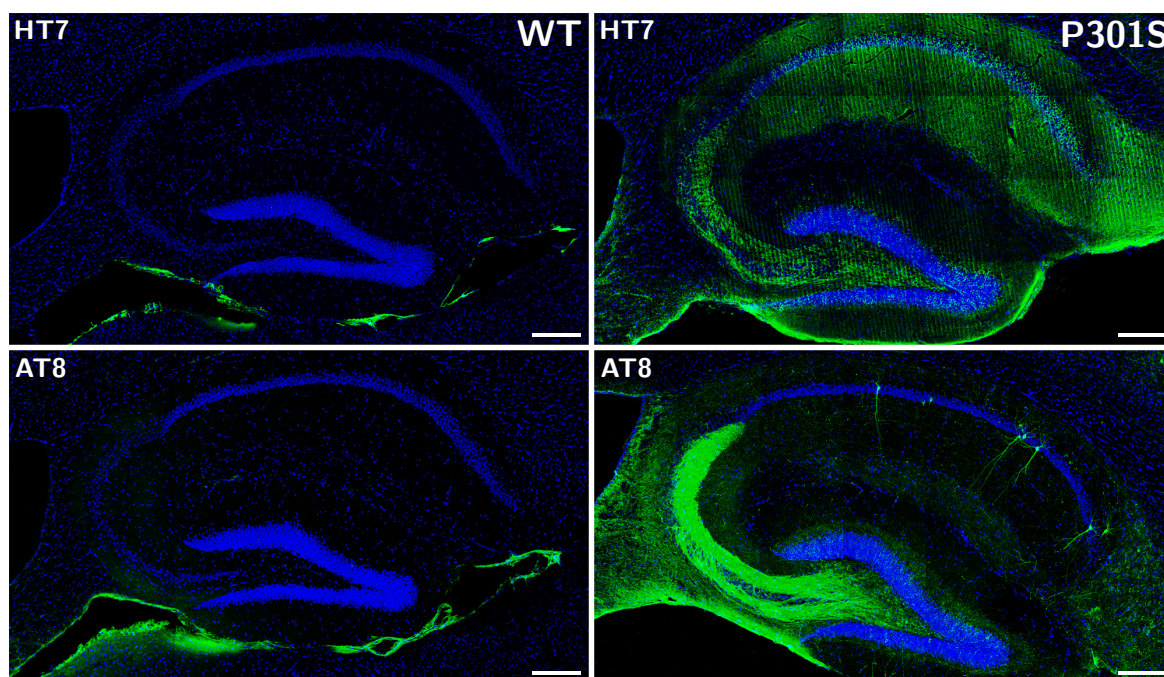
En la figura 4-1 se presentan las IF representativas del hipocampo de un ratón P301S y un control de 10 meses de edad, con anticuerpos contra tau humana (HT7) y tau hiperfosforilada (AT8). En la figura 4-2 se muestran las cuantificaciones de este último anticuerpo y de tau total (TAU-5, que marca tanto la proteína murina endógena como la humana transgénica) por WB, acompañadas de sus geles representativos.

En estas pruebas bioquímicas comprobamos que, efectivamente, la proteína tau total se encuentra aumentada en el genotipo P301S con una diferencia estadísticamente significativa (\*:  $p < 0,05$ ); de igual modo, el nivel de tau fosforilada en la serina 202 y la treonina 205

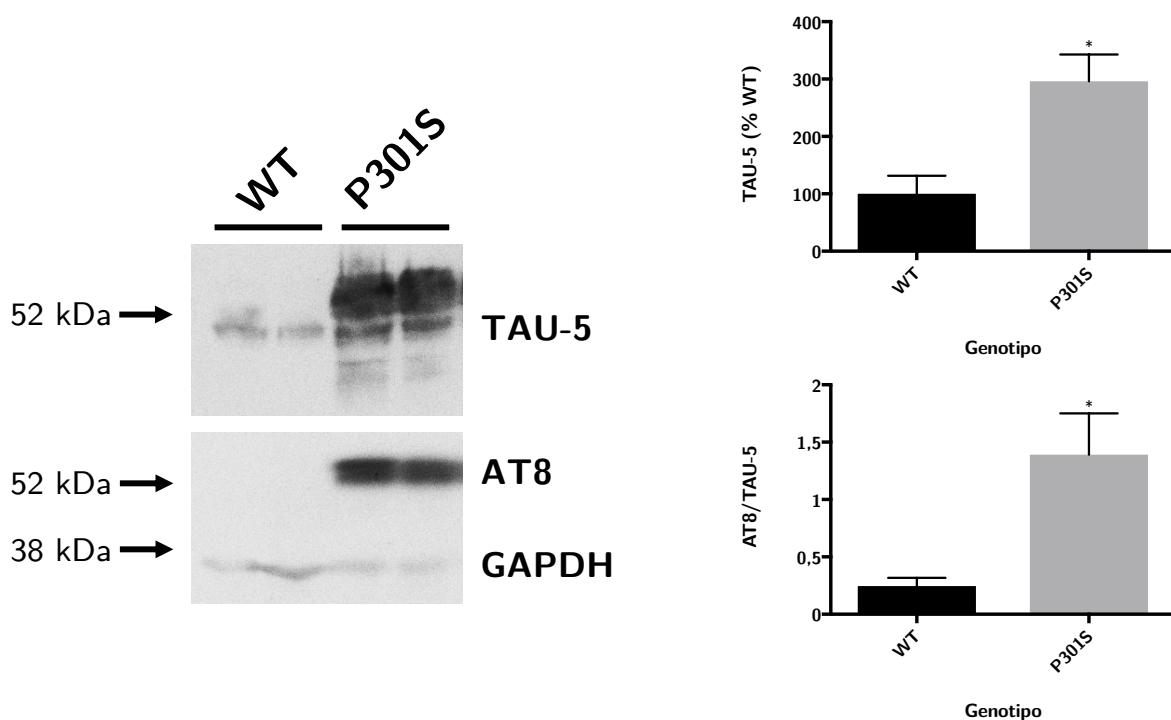
(anticuerpo AT8) también se encuentra incrementado —relativizado a la cantidad total de tau en cada caso— con la misma diferencia estadística.

En el caso de las IF, el marcado con el anticuerpo contra tau humana es inexistente en los ratones WT, y generalizado en el caso de los P301S. Para el anticuerpo contra tau hiperfosforilada, la señal también es prácticamente inexistente en los ratones WT, frente a un marcado considerable en los P301S de neuronas en la capa de células granulares del DG, el subículo, así como algunas neuronas en CA1 incluyendo sus arborizaciones dendríticas con un marcado muy intenso. Debemos destacar que, en todos los ratones P301S analizados, las fibras musgosas —eferencias de las neuronas de la GCL— se marcaron de manera muy notable mediante anticuerpos contra tau, muy especialmente con AT8. Tras una revisión de la literatura en ratones P301S, localizamos hallazgos similares con varios anticuerpos contra tau: AC312 (acetilado) y MC1 (conformación aberrante previa a la formación de ovillos) [Min, Chen *et al.*, 2015], y de nuevo con AT8 [Shi *et al.*, 2017]; no se mencionan posibles mecanismos que expliquen este marcado, tan solo que puede ser parte de la evolución histopatológica (en concreto, apareciendo en una fase temprana de la enfermedad en este modelo).

En la sección 4.5 se amplía el estudio histológico de la fosforilación de tau en el ratón P301S y su combinación con el modelo Akp2.



**Figura 4–1: Sobreexpresión e hiperfosforilación de tau humana en el hipocampo dorsal del ratón P301S (IF).** Inmunofluorescencias con los anticuerpos contra la proteína tau humana (HT7) y contra tau hiperfosforilada (AT8). La señal de HT7 es generalizada en el ratón P301S; AT8 marca abundantemente en estos ratones las neuronas de la capa de células granulares del giro dentado y del subículo, algunas neuronas piramidales de CA1, y las fibras musgosas de manera especialmente intensa. En los ratones WT la señal es inexistente con ambos anticuerpos. Edad: 10 meses. Barras de escala: 200  $\mu$ m.



**Figura 4-2: Sobreexpresión e hiperfosforilación de tau humana en el hipocampo dorsal del ratón P301S (WB).** Western blot con los anticuerpos contra tau total (TAU-5) y tau hiperfosforilada (AT8), con GAPDH como control de carga; se muestra un gel representativo con dos ratones de cada genotipo. Se cuantificó la expresión de tau y su fracción hiperfosforilada (relativizando a la cantidad total), hallándose los ratones transgénicos con niveles significativamente aumentados en ambos casos. La cuantificación se ha realizado con  $n$  (ratones) = 5 WT y 7 P301S; edad: 7 meses; los datos representados son los valores medios con el SEM. \*:  $p < 0,05$ .

#### 4.1.2 No se observó fosforilación en el aminoácido mutado Ser301 en la proteína tau-P301S expresada en el sistema nervioso central del ratón P301S

Del estudio de proteómica sobre extractos de hipocampo de ratones P301S de 7,5 meses de edad se identificaron dos péptidos distintos de la misma proteína tau con la mutación P301S. En total, fueron localizados cuatro sitios de fosforilación bien descritos en la literatura sobre esta proteína: Thr181, Ser202, Thr231 y Ser404; dichas fosforilaciones pueden ser detectadas específicamente mediante los anticuerpos AT270, AT8, AT180 y PHF1, respectivamente.

Uno de nuestros objetivos era comprobar el estado de fosforilación de la Ser301 introducida en este modelo. Los análisis no localizaron en ningún caso dicha fosforilación.

#### 4.1.3 El ratón P301S sobreexpresa la proteína tau-P301S, que se encuentra hiperfosforilada, en el sistema nervioso periférico

En la figura 4-3 se reflejan imágenes representativas por inmunohistoquímica del marcado con el anticuerpo contra la proteína tau humana (HT7) en cortes transversales y longitudinales del nervio ciático de ratones de 11 meses de edad.



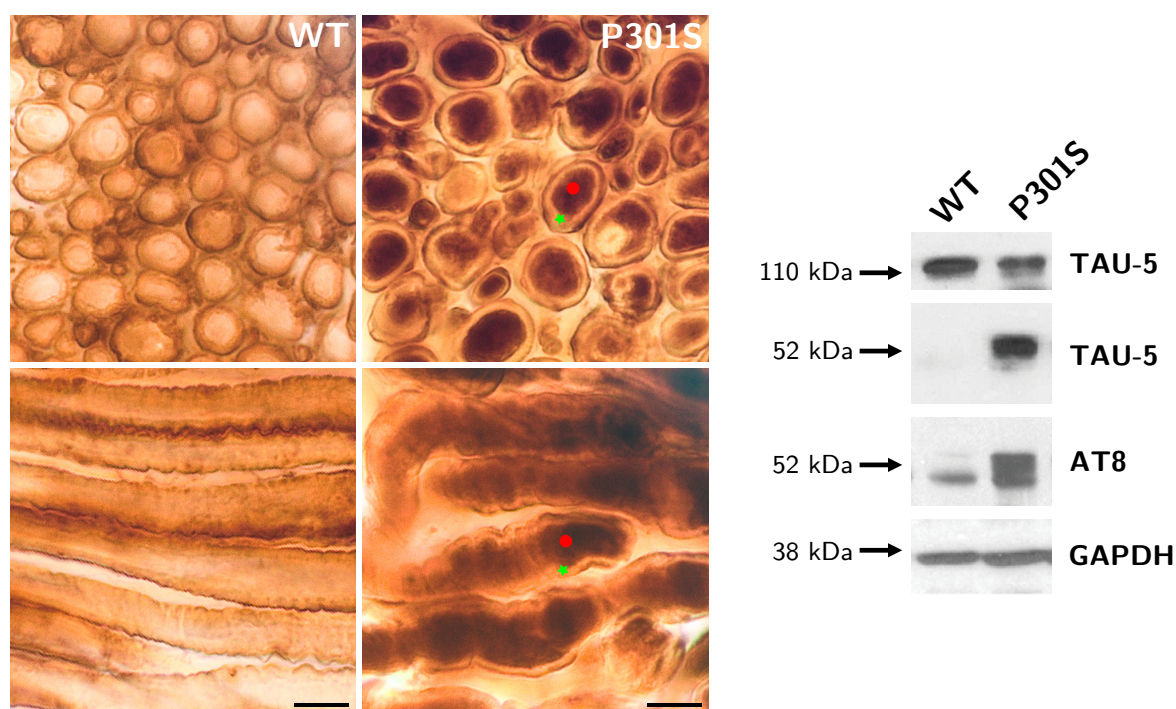
También se muestra en esta figura un *western blot* representativo empleando los anticuerpos contra tau total (TAU-5) y tau hiperfosforilada (AT8).

Con respecto a la inmunohistoquímica, en los ratones P301S se halló un marcado intenso de tau humana en los axones del nervio ciático, pero no en las vainas de mielina formadas por las células de Schwann; en los ratones control, tal y como se esperaba, no apareció señal con este anticuerpo.

A nivel bioquímico, se reprodujo el patrón observado en el sistema nervioso central: la proteína tau se encuentra sobreexpresada e hiperfosforilada en el nervio ciático de los ratones transgénicos con respecto a los ratones control.

En cuanto a la isoforma endógena exclusiva del PNS denominada *big tau*, de unos 110 kDa de peso molecular, no se apreciaron diferencias significativas entre controles y transgénicos en el *western blot*.

En la sección 4.5.7 se realiza un estudio ultraestructural detallado del nervio ciático del ratón P301S y su combinación con el modelo Akp2.



**Figura 4–3: Sobreexpresión e hiperfosforilación de tau humana en el nervio ciático del ratón P301S.** Inmunohistoquímica (IH) con el anticuerpo contra la proteína tau humana (HT7) en secciones transversales y longitudinales. *Western blot* (WB) con los anticuerpos contra tau total (TAU-5) y tau hiperfosforilada (AT8), con GAPDH como control de carga. Se aprecia la sobreexpresión de tau humana en el ratón P301S, tanto en la IH (en el axón —punto rojo—, pero no en la vaina de mielina —estrella verde—) como en el WB (isoforma de alrededor de 52 kDa); en este último se observa también su estado de hiperfosforilación; la isoforma endógena de unos 110 kDa de peso molecular, específica del sistema nervioso periférico y conocida como *big tau*, es similar en WT y P301S. Edad: 11 meses. Barras de escala: 10  $\mu$ m.



## 4.2 Neurodegeneración en el ratón P301S

En numerosas publicaciones desde la generación de la línea transgénica tau-P301S por el laboratorio de Virginia M. Lee se destaca la neurodegeneración que este modelo murino presenta a nivel del CNS: atrofia hipocampal, hiperfosforilación de tau, microgliosis y astrogliosis [Yoshiyama *et al.*, 2007] [Iba *et al.*, 2013] [Min, Chen *et al.*, 2015] [Shi *et al.*, 2017]. Tal y como se ha mencionado en la sección anterior, tras estas manifestaciones histológicas centrales, en el último tramo de la enfermedad los ratones desarrollan parálisis acompañada de temblores y atrofia muscular [Scattoni *et al.*, 2010] [Xu *et al.*, 2014].

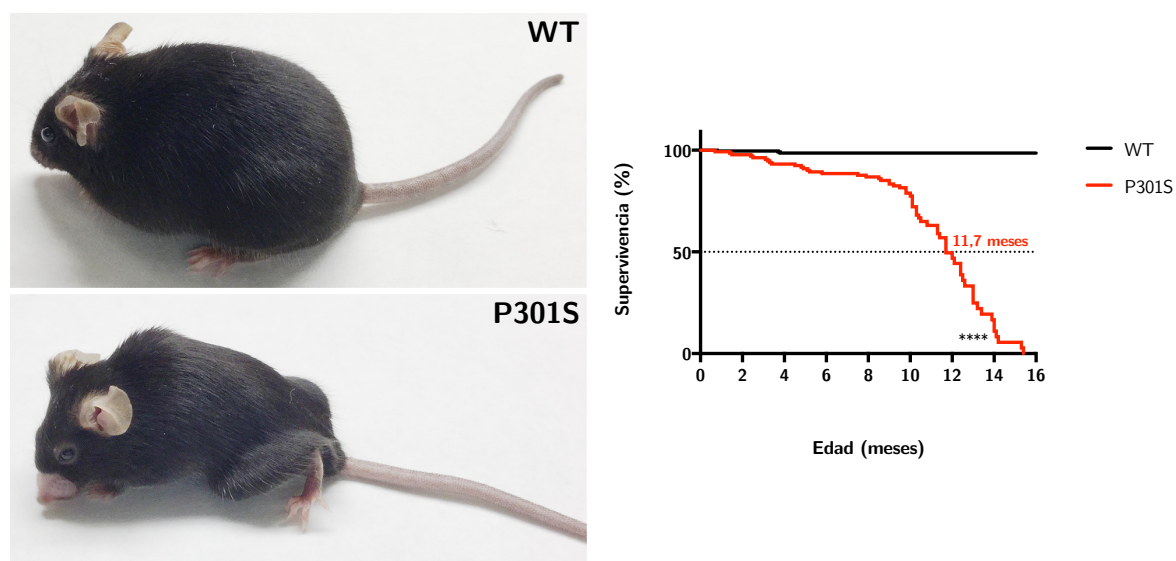
Con estos antecedentes, nos propusimos unas comprobaciones iniciales de parámetros relacionados con esta neurodegeneración, tanto histológicos como a nivel de fenotipo motor y supervivencia, en nuestro modelo de fondo genético C57BL/6J. En la sección 4.5 se amplía el análisis en el ratón P301S y su combinación con el modelo Akp2; en vista de la expresión del transgén que hemos detectado en nervio ciático y los síntomas motores una vez debutado el fenotipo terminal, se examinan tanto a nivel del CNS como del PNS.

### 4.2.1 El ratón P301S presenta un fenotipo motor de parálisis y atrofia con una supervivencia reducida

En la figura 4-4 se presentan imágenes representativas de la atrofia y caquexia que sufren los ratones P301S en las etapas avanzadas de parálisis tras el debut del fenotipo motor a partir de los 9 meses de edad. Se realizó un análisis de las curvas de supervivencia Kaplan-Meier de los ratones transgénicos y los WT a partir de todos los ratones de nuestra línea sobre los que no se efectuaron procedimientos experimentales; la supervivencia de los ratones P301S está reducida con respecto a los controles con diferencias estadísticamente muy significativas (\*\*\*\*:  $p < 0,0001$ ).

En los ratones transgénicos se observó una gran variabilidad en el momento del debut del fenotipo motor; no obstante, una vez empezado este, el avance era rápido y similar en todos ellos en duración. Antes de los 8 meses de edad no se registró ningún caso, siendo las muertes producidas hasta este punto repentinas y con el ratón en aparente buen estado de salud en los días previos. A partir de esta edad (de los 9 meses en la mayoría de los casos) comenzaron los síntomas motores, siendo evidentes habitualmente entre los 10 y los 14 meses; será por tanto en este rango donde situaremos los grupos experimentales para fases avanzadas de la neurodegeneración. La mediana de supervivencia de los ratones P301S fue de 11,7 meses.

El curso del fenotipo comienza con una parálisis ligera de las extremidades inferiores, con retraimiento de estas y temblores al elevar al ratón por la cola. Continúa con una parálisis más acusada y encogimiento general, mostrando la joroba característica y un estado caquético; los temblores son generalizados al desplazarse, con gran dificultad para las elevaciones verticales. Finalmente, la parálisis es tan grave que el ratón es incapaz de desplazarse ni alimentarse por sí mismo, muriendo en pocos días por inanición.



**Figura 4-4: Fenotipo motor y supervivencia reducida en el ratón P301S.** Imágenes representativas de un ratón WT de 12 meses y uno P301S de la misma edad en una etapa avanzada de parálisis y atrofia muscular (principalmente de las patas traseras); las curvas de supervivencia Kaplan-Meier de los dos genotipos presentan una diferencia con gran significación estadística, siendo la mediana de la supervivencia de los transgénicos de 11,7 meses (el experimento no se prolongó hasta la de los ratones control). La cuantificación se ha realizado con  $n$  (ratones) = 259 WT y 139 P301S; \*\*\*\*:  $p < 0,0001$ .

#### 4.2.2 El ratón P301S presenta atrofia hipocampal a los 11 meses de edad, pero esta no se observó con 2,5 meses

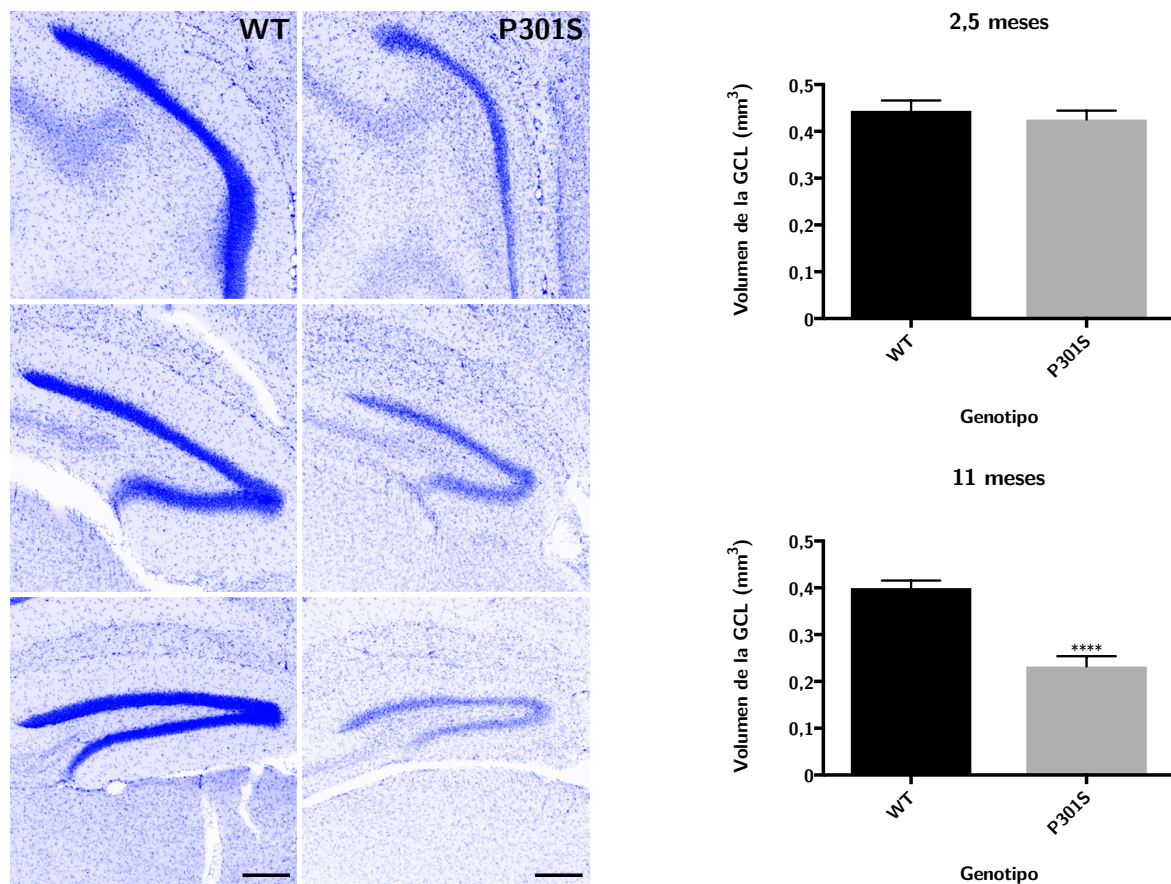
En la figura 4-5 se presentan imágenes representativas de fluorescencia (DAPI) de la GCL del giro dentado en el hipocampo dorsal de ratones P301S y controles de 11 meses de edad. Así mismo, se muestran las cuantificaciones del volumen completo de la GCL dorsal realizadas a esta edad y en ratones jóvenes de 2,5 meses.

Coincidiendo con lo descrito en la bibliografía, los ratones mayores mostraron una atrofia hipocampal; la cuantificación de la GCL, no descrita previamente, arrojó diferencias estadísticamente muy significativas con respecto a los WT de la misma edad (\*\*\*\*:  $p < 0,0001$ ). En los animales jóvenes de 2,5 meses no se observó esta atrofia degenerativa.

#### 4.2.3 El ratón P301S presenta muerte celular aumentada en el hipocampo

En la figura 4-6 se presentan imágenes representativas de IH del hipocampo dorsal de ratones P301S y controles de 9 meses de edad. Se muestran también las cuantificaciones del número de células positivas para caspasa-3 truncada (indicador del proceso de apoptosis celular) en la formación hipocampal completa.

Como era de esperar tras observar la atrofia en esta misma estructura, la muerte celular se encuentra aumentada en los ratones transgénicos mayores con respecto a los controles de la misma edad; la diferencia es estadísticamente significativa (\*:  $p < 0,05$ ).



**Figura 4–5: El giro dentado del hipocampo dorsal está atrofiado en los ratones P301S de 11 meses, pero no con 2,5 meses de edad.** El volumen de la capa de células granulares (GCL) ha sido cuantificado con  $n$  (ratones) = 10 WT y 9 P301S para 2,5 meses, y  $n$  = 12 WT y 10 P301S para 11 meses; los datos representados son los valores medios con el SEM; las imágenes DAPI (fondo invertido) muestran la GCL de los animales de 11 meses a lo largo del eje mediolateral. Barras de escala: 200  $\mu$ m; \*\*\*\*:  $p < 0,0001$ .

### 4.3 Pruebas comportamentales en el ratón P301S

Dentro de la literatura de los modelos murinos que incorporan tau humano con la mutación P301S, el fenotipo comportamental con más consenso es el de hiperactividad motora y respuesta ansiosa reducida; este estado precede al debut de los problemas motores y se suele medir con pruebas como el laberinto en cruz elevado (*elevated plus maze*) o el campo abierto (OF, *open field*) [Scattoni *et al.*, 2010] [Takeuchi *et al.*, 2011] [Xu *et al.*, 2014].

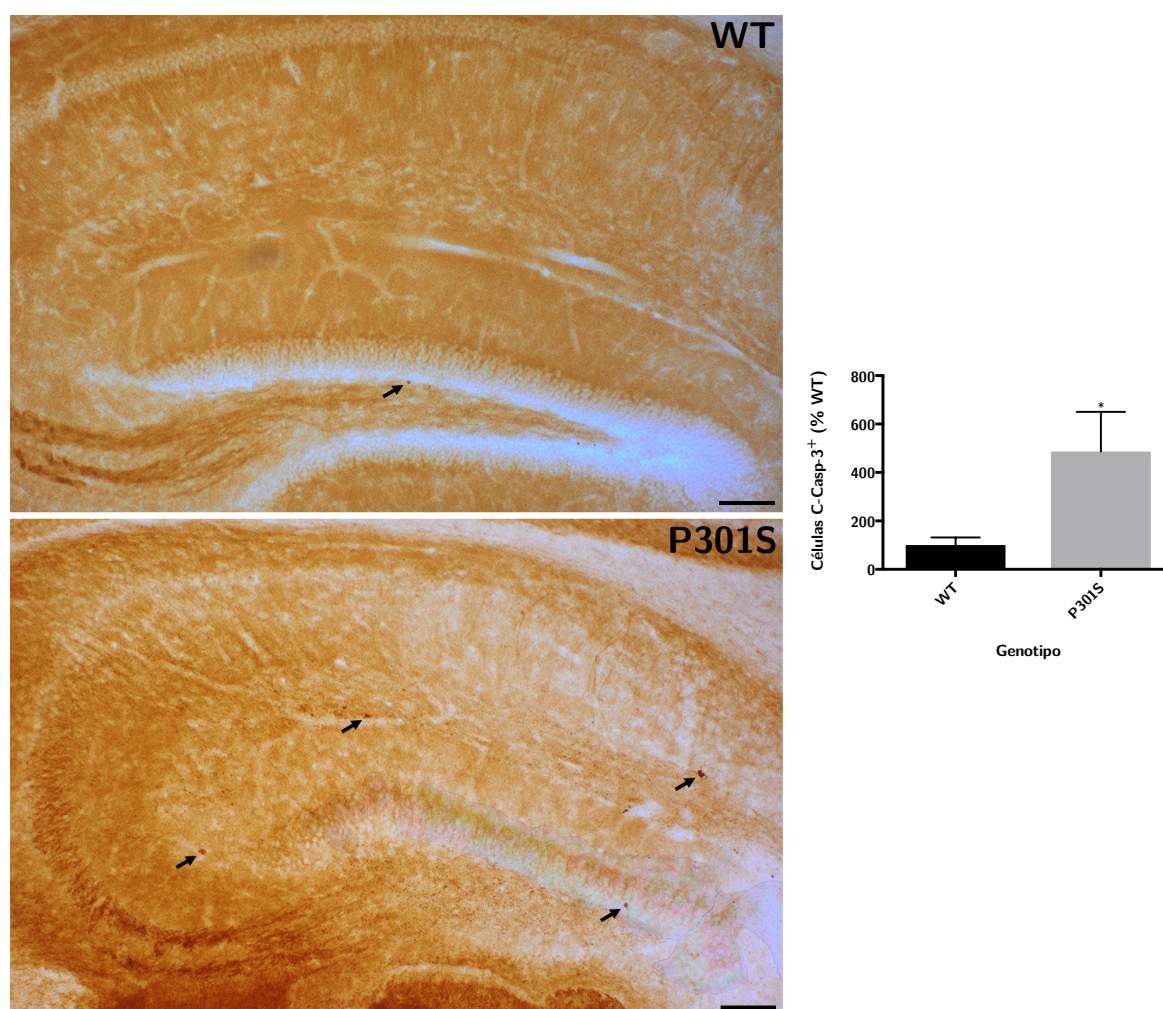
Con respecto a las pruebas de memoria y navegación espacial dependientes de hipocampo, las más utilizadas son el laberinto acuático de Morris (MWM, *Morris water maze*) y el laberinto circular de Barnes (*Barnes circular maze*). Los resultados en la bibliografía no muestran un déficit significativo de los tau-P301S de manera unánime; de las principales publicaciones revisadas, mencionamos tres a continuación.

En el estudio comportamental del equipo de Michael Goedert con su ratón tau-P301S, de fondo genético C57BL/6J al igual que nuestro modelo pero con diferente promotor del



transgén (ver la sección 1.4), no se encontraron diferencias significativas en la ejecución de las tareas espaciales en la prueba del MWM entre los ratones transgénicos y los WT (ni en la fase de entrenamiento ni en la prueba de la sonda) [Scattoni *et al.*, 2010]; en esta misma prueba sí resultaron significativas de nuevo las diferencias en parámetros relacionados con su hiperactividad, como son la velocidad media y el recorrido total en la natación.

En otra publicación con el ratón de Goedert, los ratones presentaron algunas diferencias significativas en las curvas de aprendizaje de los días de entrenamiento del MWM (mayor latencia media para encontrar la plataforma en los dos últimos días), pero no en la prueba de la sonda para la evaluación del aprendizaje adquirido (preferencia por el cuadrante de la plataforma) [Xu *et al.*, 2014].



**Figura 4–6: El hipocampo dorsal presenta una muerte celular aumentada en el ratón P301S.** Imágenes representativas (flechas apuntando a las células positivas) y cuantificación inmunohistoquímica del número de células positivas en la formación hipocampal empleando el anticuerpo contra caspasa-3 proteolizada (activa), C-Casp-3. La cuantificación se ha realizado con  $n$  (ratones) = 5 WT y 5 P301S; edad: 9 meses; los datos representados son los valores medios con el SEM. Barras de escala: 100  $\mu$ m; \*:  $p < 0,05$ .

Finalmente, en el estudio comportamental del grupo de Virginia Lee se evaluaron estas habilidades con dos pruebas distintas sobre el ratón P301S con dos fondos genéticos diferentes [Takeuchi *et al.*, 2011]:

- MWM con fondo genético híbrido B6C3F1: se encontraron diferencias significativas tanto en el entrenamiento (latencias medias mayores para los transgénicos) como en la prueba de la sonda. No obstante, los ratones P301S aprendieron la tarea (tal y como refleja su curva de aprendizaje de latencias decrecientes) y presentaron, en la prueba de la sonda, una preferencia en tiempo por el cuadrante de la plataforma por encima del 35 % (frente al 25 % puramente aleatorio cuando no se logra el aprendizaje).
- Laberinto circular de Barnes con fondo genético C57BL/6J: no se encontraron diferencias significativas durante la fase de entrenamiento en ningún parámetro (distancias, latencias, errores), ni tampoco en la prueba de la sonda, donde tanto transgénicos como controles habían aprendido la localización del agujero de escape. Este es el mismo modelo murino que el utilizado por nosotros en todos los experimentos de esta tesis.

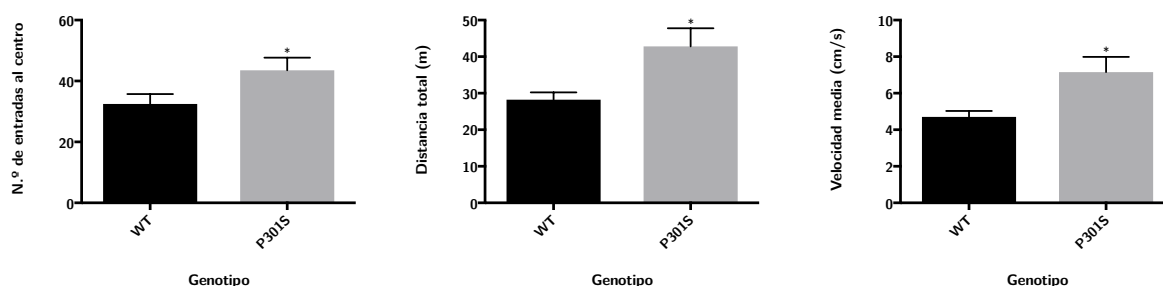
Con estos datos previos nos propusimos una caracterización comportamental de nuestro modelo P301S. Se corroborará, por un lado, su comportamiento hiperactivo con ansiedad disminuida aplicando la prueba de OF; por otro lado, analizaremos los posibles déficits de memoria y navegación espacial dependientes de hipocampo, para lo que realizaremos el ya mencionado MWM; finalmente, aplicaremos la prueba de preferencia de nueva posición (NLP, *Novel-location preference*), que se ejecuta en combinación con la de OF y permite evaluar la capacidad de distinguir entre contextos similares, habilidad íntimamente ligada a las puestas en juego en el MWM y relacionada con la neurogénesis adulta hipocampal (ver la sección 3.4).

En la sección 4.5.8 se amplía el análisis de comportamiento con las pruebas motoras de rotarod en edades crecientes del ratón P301S y su combinación con el modelo Akp2.

#### 4.3.1 El ratón P301S presenta un comportamiento hiperactivo y de baja ansiedad en la prueba de campo abierto

Replicando los resultados previos publicados que ya hemos comentado, nuestra colonia de ratones P301S presentó hiperactividad en la prueba de OF en todos los indicadores medidos —velocidad media y distancia total recorrida—, así como una respuesta ansiosa reducida con respecto al grupo control —aumento significativo en el número de entradas a la zona central—; todas las diferencias fueron estadísticamente significativas (\*:  $p < 0,05$ ). Los resultados se pueden consultar en la figura 4-7.

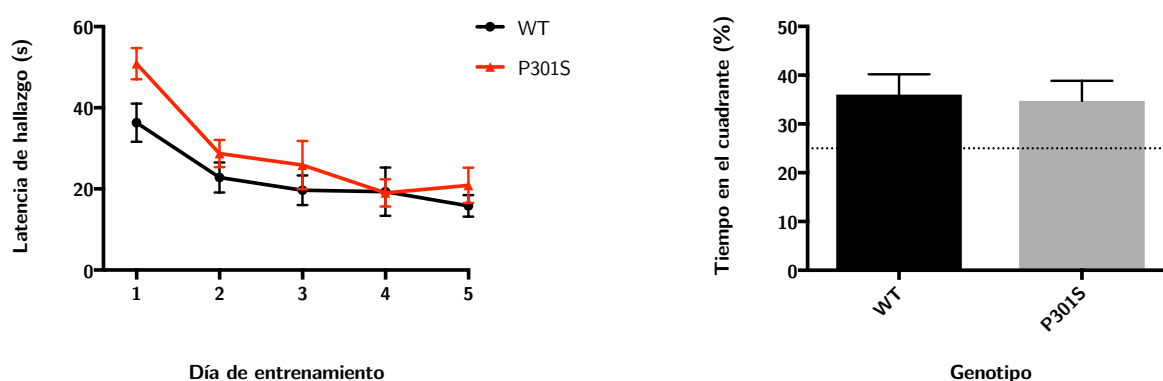
Se seleccionó un grupo de edad avanzada (9,5 meses) para comprobar si estos efectos se mantienen justo antes de la aparición de la parálisis; ningún ratón presentó problemas motores durante la prueba que pudieran interferir en los parámetros estudiados.



**Figura 4–7: Comportamiento hiperactivo y respuesta ansiosa disminuida en la prueba de campo abierto del ratón P301S.** Se cuantificaron el número de entradas a la zona central, la distancia total recorrida y la velocidad media durante la prueba; en todos los parámetros los ratones P301S presentan aumentos significativos con respecto a los controles. La cuantificación se ha realizado con  $n$  (ratones) = 11 WT y 10 P301S para el número de entradas al centro, y  $n$  = 11 WT y 11 P301S para los otros dos análisis; edad: 9,5 meses; los datos representados son los valores medios con el SEM. \*:  $p < 0,05$ .

#### 4.3.2 No se encontraron diferencias significativas en la prueba del laberinto acuático de Morris del ratón P301S

Ambos grupos aprendieron correctamente la tarea, sin diferencias significativas entre ellos ni en el entrenamiento ni en la prueba de la sonda. Tal y como se resume en la figura 4–8, este aprendizaje se refleja en el entrenamiento, donde la latencia de hallazgo de la plataforma disminuye a lo largo de los días de manera similar en transgénicos y controles, y también en la prueba de la sonda, donde el porcentaje de tiempo en el cuadrante de la plataforma es significativamente superior al tiempo en cada uno de los otros tres (36 % para los WT, y 35 % para los P301S); el nivel del 25 %, esperable en caso de que no se produzca el aprendizaje, aparece marcado con línea punteada en la gráfica correspondiente.



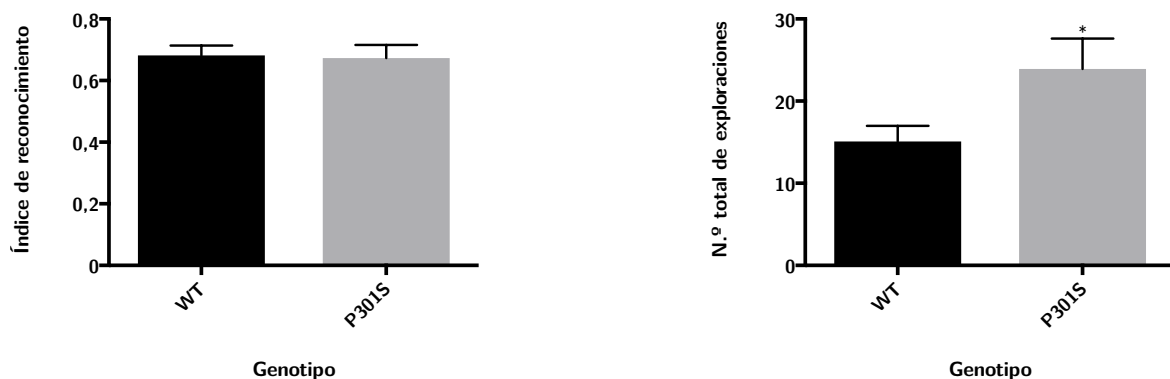
**Figura 4–8: No se encontraron diferencias significativas en la prueba del laberinto acuático de Morris en el ratón P301S.** Curvas de aprendizaje de los 5 días de entrenamiento (latencia hasta el hallazgo de la plataforma), y porcentaje de tiempo en el cuadrante de la plataforma en la prueba de la sonda del sexto día; no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los parámetros analizados. La cuantificación se ha realizado con  $n$  (ratones) = 6 WT y 7 P301S para las curvas de aprendizaje, y  $n$  = 7 WT y 7 P301S para la prueba de la sonda; edad: 5,5 meses; los datos representados son los valores medios con el SEM; la línea discontinua marca el límite del 25 % del tiempo en el cuadrante.

Dado que el ejercicio de natación es muy demandante físicamente, para evitar interferencias inducidas por dificultades motoras asociadas al fenotipo de los ratones P301S, se estimó conveniente la aplicación de esta prueba en una edad más temprana que en el resto de pruebas; dicha edad se seleccionó de acuerdo a las pruebas del MWM sobre este modelo consultadas en la bibliografía, y fue fijada en 5,5 meses.

#### 4.3.3 El ratón P301S presenta un comportamiento hiperactivo sin diferencias significativas en el reconocimiento en la prueba de preferencia de nueva posición

El índice de reconocimiento, que muestra la proporción de exploraciones que dedican los ratones a la pieza que cambia de posición en el día final de la prueba de NLP, mostró una separación de patrones correcta, sin diferencias significativas entre el grupo transgénico y el control (67 % y 68 %, respectivamente). El número total de exploraciones sobre ambas piezas en este mismo día, que hemos empleado como un indicador adicional del grado de actividad, evidenció de nuevo diferencias significativas (\*:  $p < 0,05$ ) a favor de una hiperactividad de los ratones P301S. Los resultados se resumen en la figura 4-9.

Estos datos están en consonancia con el resto de nuestros resultados, mostrados hasta ahora en esta misma sección, tanto en lo referente al comportamiento hiperactivo y de baja ansiedad, como en la ausencia de diferencias significativas en las pruebas de memoria y localización espacial dependientes de hipocampo. Así mismo, la bibliografía mencionada anteriormente respalda nuestros análisis, que coinciden en cuanto a las habilidades de navegación y memoria de referencia con los de aquellas publicaciones que no encuentran diferencias estadísticamente significativas en las pruebas de esta índole; con respecto a los niveles de actividad en la exploración de objetos, una medida muy similar al colocar un objeto al final del OF obtiene también resultados equivalentes en la literatura [Scattoni *et al.*, 2010].



**Figura 4-9: Comportamiento hiperactivo sin diferencias significativas en el reconocimiento en la prueba de preferencia de nueva posición del ratón P301S.** Se cuantificó el índice de reconocimiento (porcentaje de exploraciones en la pieza movida), y también el número total de exploraciones en las dos piezas como medida de la actividad. La cuantificación se ha realizado con  $n$  (ratones) = 11 WT y 11 P301S; edad: 9,5 meses; los datos representados son los valores medios con el SEM. \*:  $p < 0,05$ .

Esta prueba fue realizada sobre los mismos ratones que la de OF, a continuación de esta; de nuevo, ningún ratón presentó problemas motores durante su ejecución que pudieran interferir en los parámetros estudiados. Por lo tanto, teniendo en cuenta los dos últimos resultados descritos, hemos obtenido buenos rendimientos en pruebas de memoria asociada a la función hipocampal tanto en edades intermedias con el MWM (5,5 meses), como en edades más avanzadas con la NLP (9,5 meses).

#### 4.4 Neurogénesis adulta en el ratón P301S

Tal y como se ha detallado en la sección 1.5, la literatura acerca de la relación entre las enfermedades neurodegenerativas y la neurogénesis adulta es contradictoria, existiendo estudios que la encuentran aumentada y otros en los que aparece reducida, tanto en pacientes humanos como en modelos animales. En el modelo murino más próximo al nuestro del que hay publicados datos de neurogénesis adulta, el ratón tau-P301L, no se encontró ninguna diferencia significativa [Boekhoorn *et al.*, 2006].

Inicialmente, localizaremos la fase en la que comienza a expresarse el transgén tau-P301S dentro de la neurogénesis adulta en la SGZ del hipocampo dorsal, examinando distintos marcadores expresados a lo largo de la maduración y diferenciación de los neuroblastos (para una introducción al respecto, consultar la sección 1.5).

No hemos encontrado en la bibliografía un análisis similar para este transgén; es de esperar un esquema equivalente al de promotor bajo el que se expresa, el de la proteína priónica murina (*Prnp*). La literatura sobre su expresión dentro de la neurogénesis adulta ubica el inicio de esta tras la diferenciación del neuroblasto [Tremblay *et al.*, 2007]; más específicamente, la expresión del promotor aumenta en la neurogénesis adulta hipocampal según progresa la maduración de las nuevas neuronas, llegando a su máxima expresión en neuronas completamente maduras (NeuN<sup>+</sup>) [Steele *et al.*, 2006].

Tras este análisis, estudiaremos la posible alteración de la neurogénesis de nuestro modelo en la misma región. Nos centraremos en dos de los marcadores habitualmente empleados, pertenecientes a etapas intermedias/finales de este proceso:

- Doblecortina (DCX), una proteína asociada a microtúbulos presente específicamente en neuronas de nueva generación en la fase de migración y extensión de neuritas [Francis *et al.*, 1999] [Gleeson *et al.*, 1999].
- Calretinina (Calr), que solapa con DCX y el marcador de neuronas maduras NeuN, señala en las últimas fases de la neurogénesis adulta la etapa en la que se establecen las conexiones de la neurona de nueva generación [Kempermann, Jessberger *et al.*, 2004] [Ming y Song, 2005]. Este marcador también está asociado a interneuronas gabaérgicas distribuidas por todo el hipocampo [Jacobowitz y Winsky, 1991] [A. I. Gulyás *et al.*, 1992] [Miettinen *et al.*, 1992]; por ello, nos centraremos en la población Calr<sup>+</sup> de la



SGZ. Esta subpoblación ha sido analizada dentro de la neurogénesis adulta en gran número de publicaciones, y ha sido determinada como buen indicador para establecer el estado de esta [Verdaguer *et al.*, 2015].

Finalmente, realizaremos un análisis detallado de las arborizaciones dendríticas de las nuevas neuronas 8 semanas después del inicio de su maduración, cuando ya se encuentran completamente integradas en el circuito hipocampal [Jones *et al.*, 2003]; para ello, emplearemos el retrovirus PSD95:GFP (ver la sección 3.3 para los detalles del procedimiento).

A este respecto tampoco se han encontrado estudios similares publicados en un modelo tau-P301S. Tan solo dos análisis de las espinas dendríticas en el ratón de Michael Goedert (descrito en la sección 1.4): uno, en neuronas piramidales de CA1 [Xu *et al.*, 2014], y, otro, en neuronas corticales [Hoffmann *et al.*, 2013]; en ambos casos la densidad de las espinas era significativamente menor en los tau-P301S, pero en neuronas adultas de las citadas regiones (no provenientes de neurogénesis adulta). Un estudio de la morfología dendrítica en neurogénesis adulta similar al presentado en esta tesis se puede encontrar en una publicación con el modelo murino VLW de tau con tres mutaciones de la FTDP-17 (consultar la sección 1.4); en este caso, se hallaron significativamente disminuidas la longitud dendrítica total y la de la dendrita primaria, así como aumentado el porcentaje de neuronas con más de una dendrita primaria (denominadas en «V») [Terreros-Roncal *et al.*, 2019].

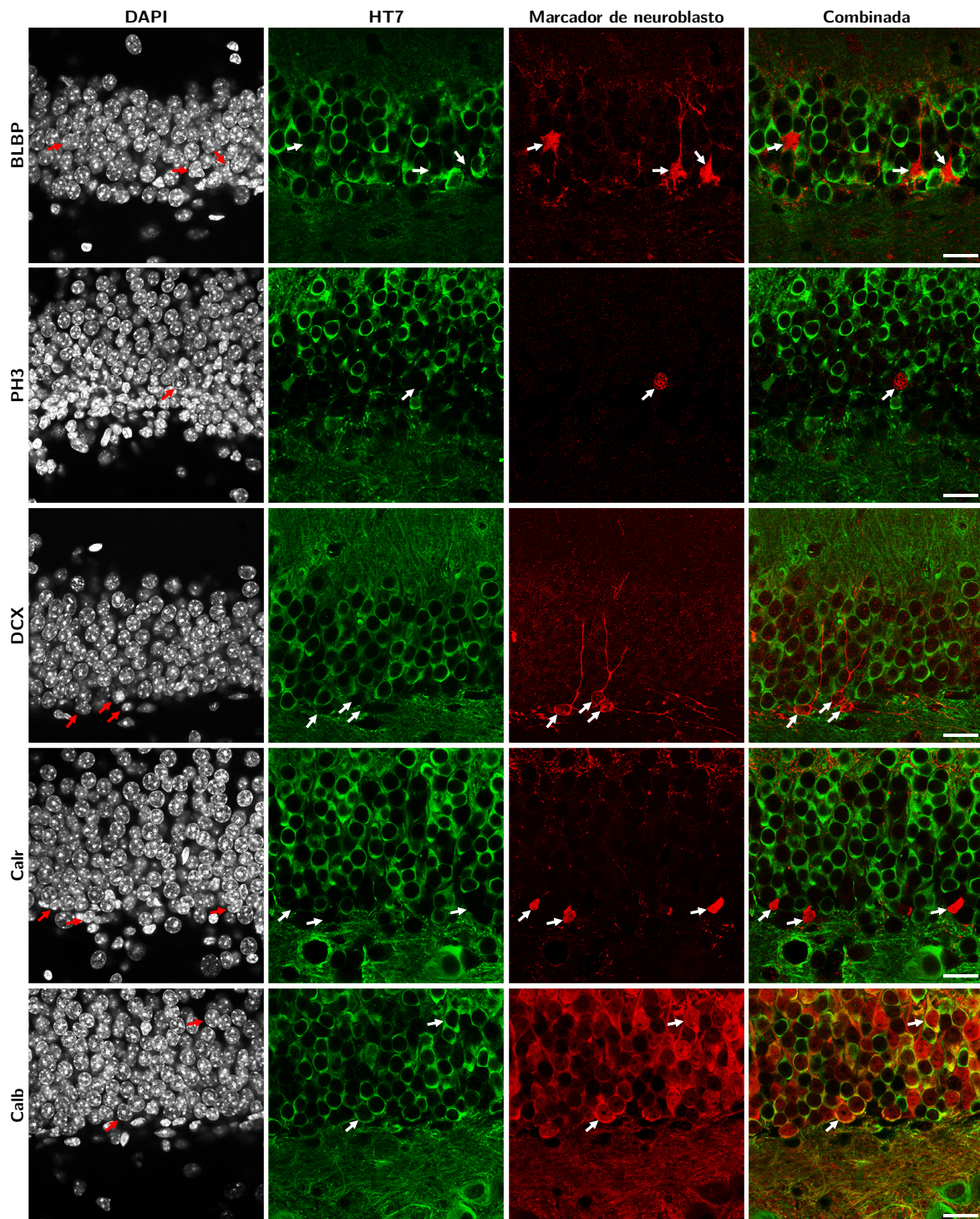
A continuación presentamos nuestros resultados en el modelo murino P301S con fondo genético C57BL/6J. La versión ampliada de este análisis, que incluye al modelo Akp2 y su combinación con el P301S, se puede consultar en la sección 4.5.5.

#### 4.4.1 El ratón P301S presenta una expresión tardía del transgén en la neurogénesis hipocampal adulta

En la figura 4–10 se resume el estudio, en un ratón de 10 meses de edad, de colocación por IF del anticuerpo contra el transgén de tau humana (HT7) y los distintos marcadores seleccionados para definir la evolución cronológica del proceso experimentado por los neuroblastos en la neurogénesis adulta: BLBP, fosfo-histona H3 (PH3), doblecortina (DCX), calretinina (Calr) y calbindina (Calb).

No se hallaron neuronas HT7<sup>+</sup> que fueran positivas para dichos marcadores hasta la última etapa, en neuronas ya maduras Calb<sup>+</sup>, donde la colocación de ambos marcadores es clara. En esta fase las neuronas granulares ya son maduras y están totalmente integradas en el circuito sináptico hipocampal, colocándose con el marcador NeuN (aunque este comienza antes su expresión); en la sección 1.5 se encuentra una descripción de la evolución cronológica de todo el proceso.

Podemos concluir, por tanto, que la expresión del transgén en la neurogénesis adulta en la SGZ del hipocampo dorsal es tardía, coincidiendo este resultado con los existentes en la bibliografía para el promotor de *Prnp* murino.

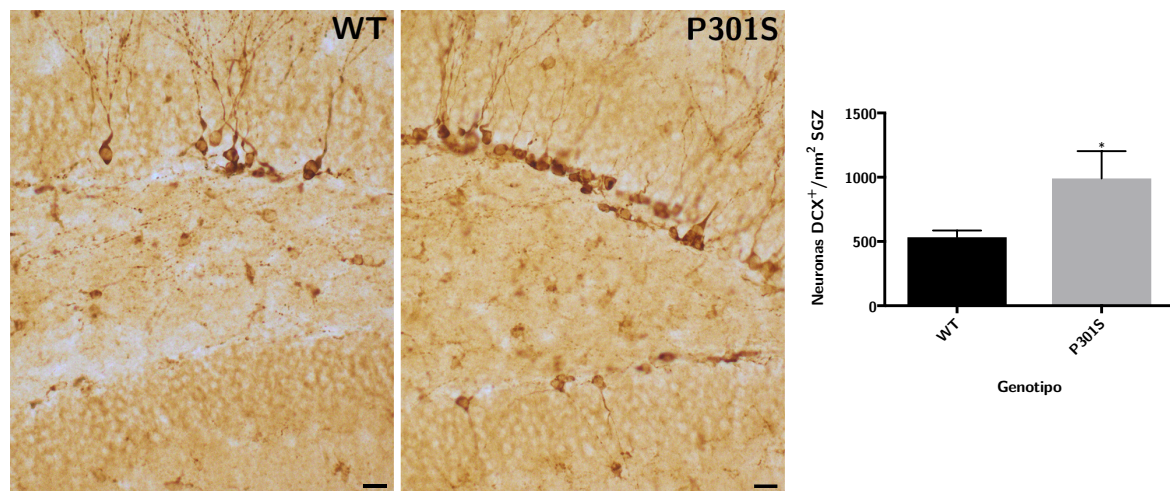


**Figura 4–10: Expresión tardía del transgén (marcador anti-tau HT7) durante la neurogénesis adulta en la zona subgranular del hipocampo dorsal del ratón P301S.** El desarrollo de los neuroblastos es analizado en inmunofluorescencia con los siguientes marcadores (orden cronológico): BLBP, fosfo-histona H3 (PH3), doblecortina (DCX), calretinina (Calr) y calbindina (Calb); el transgén se expresa desde la etapa Calb<sup>+</sup> (sus flechas apuntan a ejemplos de neuronas doble positivas). Edad: 10 meses. Barras de escala: 20  $\mu$ m.

#### 4.4.2 El ratón P301S presenta un aumento de células DCX<sup>+</sup> en la neurogénesis hipocampal adulta

Se cuantificó el número de neuronas positivas para doblecortina en la SGZ del hipocampo dorsal a los 9 meses de edad, encontrándose un aumento estadísticamente significativo (\*:  $p < 0,05$ ) en el modelo P301S. Esto sugiere un aumento de la neurogénesis hipocampal adulta en esta región, al menos hasta la fase de migración y extensión de procesos que demarca DCX.

En la figura 4-11 se presenta la cuantificación de este resultado, acompañada de dos imágenes representativas de IH para DCX. En la sección 4.5.5 se amplía el análisis de la neurogénesis mediante DCX, añadiendo el modelo Akp2 y su combinación Akp2/P301S.



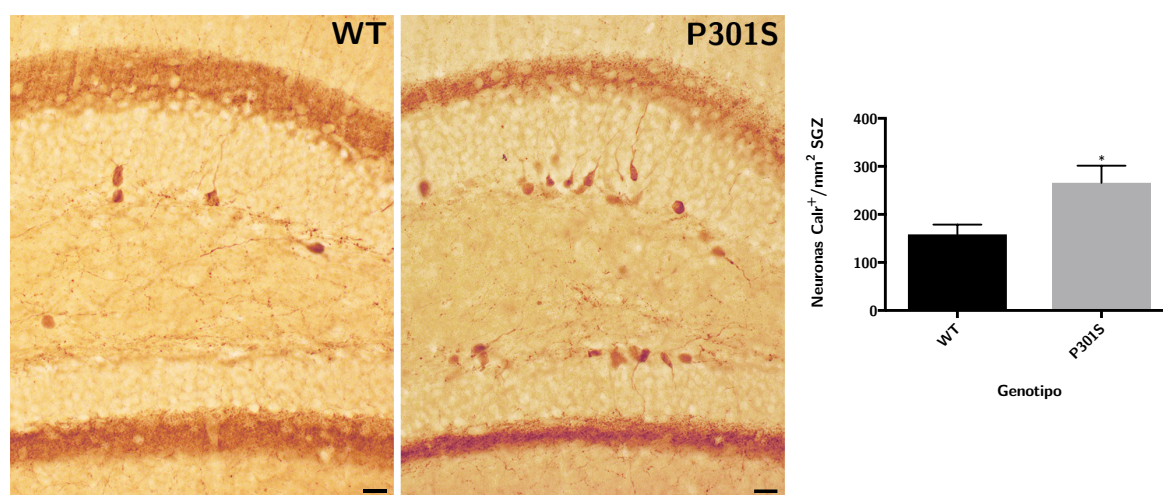
**Figura 4-11: Aumento de células DCX<sup>+</sup> en el hipocampo dorsal del ratón P301S.** Imágenes representativas y cuantificación inmunohistoquímica en la zona subgranular (SGZ) empleando el anticuerpo contra doblecortina (DCX);  $n$  (ratones) = 10 WT y 6 P301S; edad: 9 meses; los datos representados son los valores medios con el SEM. Barras de escala: 20  $\mu$ m; \*:  $p < 0,05$ .

#### 4.4.3 El ratón P301S presenta un aumento de células Calr<sup>+</sup> en la neurogénesis hipocampal adulta

Dado el resultado anterior, en el que determinamos un aumento de las neuronas DCX<sup>+</sup> en la SGZ del hipocampo dorsal, resultaba muy conveniente ampliar el análisis a la etapa más tardía posible de diferenciación en la neurogénesis adulta antes de la madurez completa, pues los marcadores de esta última, como son calbindina o NeuN, se expresan también en el resto de neuronas granulares del DG que no tienen un origen neurogénico en el adulto. De este modo, se seleccionó la calretinina como el mejor marcador, pues se trata de uno de los últimos del proceso, siendo expresado en la fase de contactos sinápticos de las dendritas; en la figura 4-12 se presentan las cuantificaciones e imágenes representativas de IH.



Al igual que en el caso de la DCX, se cuantificó el número de neuronas Calr<sup>+</sup> en la zona subgranular del hipocampo dorsal; de nuevo, se encontró un aumento estadísticamente significativo (\*:  $p < 0,05$ ) en los ratones P301S, que tenían 11 meses de edad. Este dato reafirma el anterior en apoyo de un aumento de la neurogénesis hipocampal adulta en esta región; dado que también las nuevas neuronas Calr<sup>+</sup> se encuentran aumentadas en número, otros escenarios, como que haya una detención de la diferenciación en la fase DCX<sup>+</sup>, resultan más inverosímiles, y podemos asumir que el aumento es generalizado y llega hasta el final del proceso neurogénico.



**Figura 4-12: Aumento de células Calr<sup>+</sup> en el hipocampo dorsal del ratón P301S.** Imágenes representativas y cuantificación inmunohistoquímica en la zona subgranular (SGZ) empleando el anticuerpo contra calretinina (Calr);  $n$  (ratones) = 12 WT y 10 P301S; edad: 11 meses; los datos representados son los valores medios con el SEM. Barras de escala: 20  $\mu$ m; \*:  $p < 0,05$ .

#### 4.4.4 No se encontraron diferencias significativas en la morfología dendrítica de la neurogénesis hipocampal adulta del ratón P301S

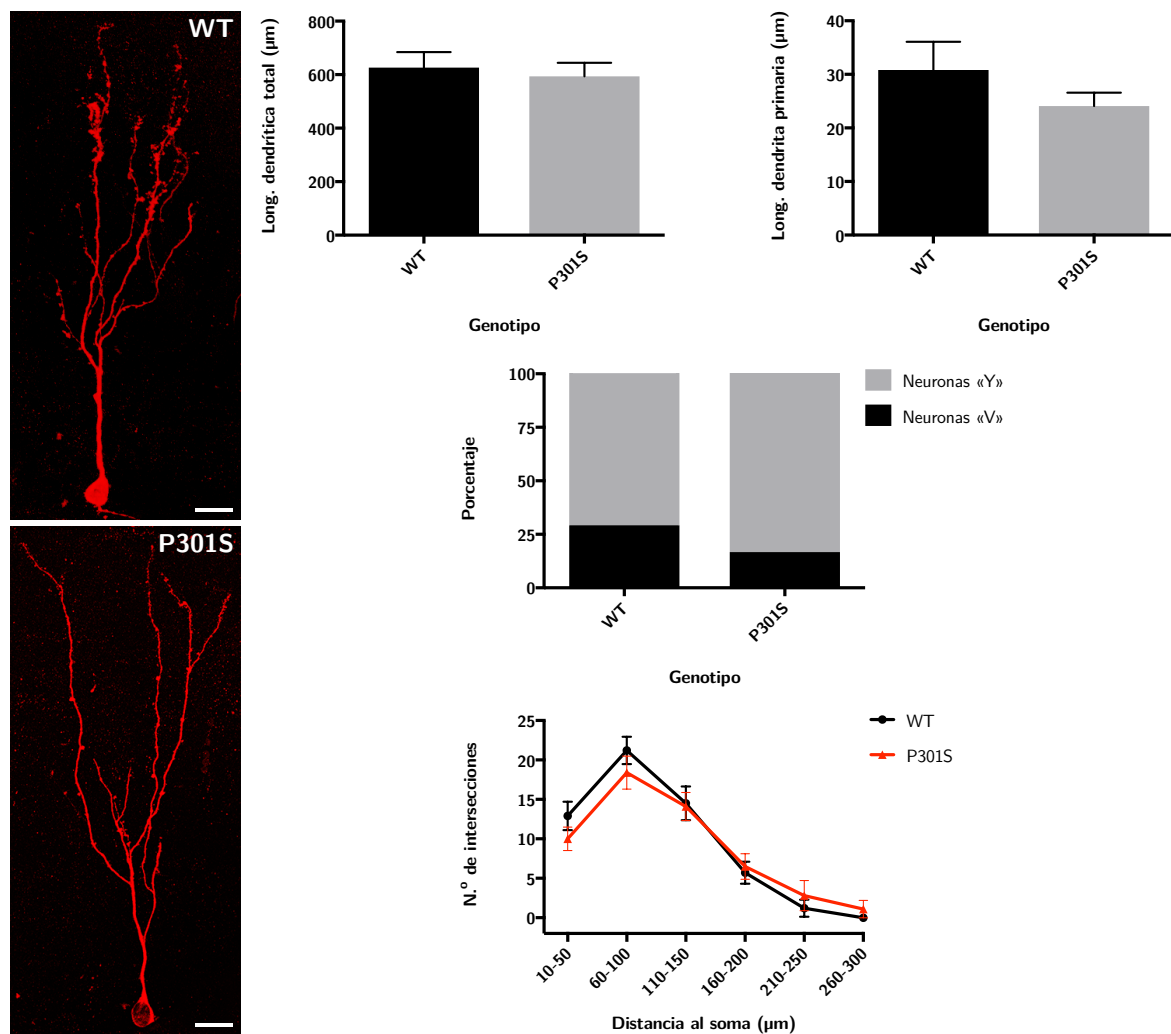
Siguiendo el procedimiento detallado en la sección 3.3, se realizaron inyecciones estereotáxicas del retrovirus PSD95:GFP en el giro dentado de animales de 8 semanas de edad; de este modo, tras sacrificarlos 8 semanas después, se pudo analizar la morfología de las dendritas de aquellos neuroblastos de la SGZ que se encontraban proliferando en el momento de la inoculación, y ya maduros y totalmente integrados en el momento del sacrificio.

Fueron estudiados los siguientes parámetros del árbol dendrítico de las nuevas neuronas:

- Longitud dendrítica total del árbol.
- Longitud de la dendrita primaria (si hay varias, se considera la media).
- Porcentaje de neuronas con más de una dendrita primaria (árbol típicamente en forma de «V») frente a la morfología más frecuente en los WT, con una sola (árbol en «Y»).

- Análisis de Sholl, que mide el grado de arborización de las dendritas al calcular el número de intersecciones del árbol dendrítico con círculos concéntricos centrados en el soma y separados 10  $\mu\text{m}$  entre sí. Se presentan y cuantifican las sumas parciales del total de intersecciones cada 50  $\mu\text{m}$ .

En ninguno de los parámetro se encontraron diferencias significativas. En la figura 4-13 se detallan estos resultados, junto a árboles dendríticos representativos de WT y P301S.



**Figura 4-13:** No se encontraron diferencias significativas en la morfología dendrítica de la neurogénesis adulta en la zona subgranular del hipocampo dorsal del ratón P301S. Tras la infección con el retrovirus PSD95:GFP, se realizó una inmunofluorescencia con el anticuerpo anti-GFP (imágenes representativas); no se encontraron diferencias significativas en los distintos parámetros analizados: longitud dendrítica total, longitud de la dendrita primaria, proporción de neuronas en «V», ni en el análisis de Sholl (número de intersecciones según la distancia al soma). Las cuantificaciones se han hecho con  $n$  (neuronas) = 10 (long. dendrítica total y análisis de Sholl), 23 (long. dendrita primaria), y 24 (neuronas «V»); fueron tomadas de 3 ratones WT y 2 P301S, inoculados con 8 semanas de edad y sacrificados 8 semanas más tarde. Los datos representados son los valores medios con el SEM; para los porcentajes, las proporciones se presentan con barras apiladas. Barras de escala: 20  $\mu\text{m}$ .

## 4.5 Estudio de los modelos P301S y Akp2

En esta sección expondremos los distintos análisis realizados sobre los cuatro grupos de genotipos resultantes tras cruzar nuestro modelo P301S con el modelo haploinsuficiente de la enzima TNAP: WT, Akp2, P301S y Akp2/P301S; todos los estudios se han llevado a cabo con animales que, en el momento del sacrificio, tenían una edad de 9-10 meses.

Se ampliaron nuestros estudios en el modelo P301S, descritos en los resultados anteriores, añadiendo además la dimensión del genotipo combinado Akp2/P301S para determinar los posibles cambios que el déficit de la fosfatasa extracelular pudiera aportar a nuestro modelo de FTDP-17, de acuerdo a lo establecido en los objetivos de esta tesis (ver la sección 2).

Se abordarán secuencialmente los resultados obtenidos en las siguientes áreas: neurodegeneración en el CNS (sobreexpresión e hiperfosforilación de tau, astrogliosis, microgliosis y atrofia hipocampal), neurogénesis adulta (cuantificación de células positivas para el marcador doblecortina en la SGZ del giro dentado), neurodegeneración en el PNS (nervio ciático), y comportamiento (rotarod). Además, se presentan correlaciones de interés entre distintas variables medidas.

### 4.5.1 Los genotipos P301S y Akp2/P301S sobreexpresan la proteína tau-P301S, que se encuentra hiperfosforilada, en el sistema nervioso central

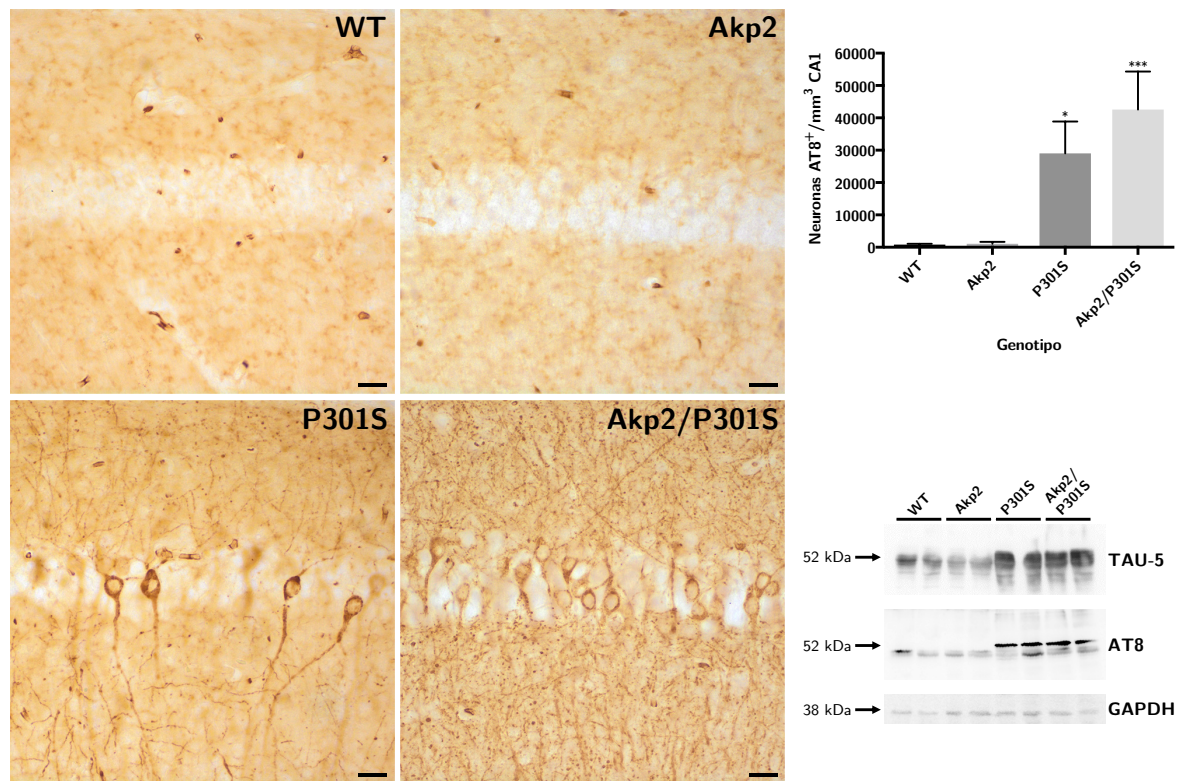
En la figura 4-14 se resumen los resultados relativos a la expresión y estado de hiperfosforilación de tau en el hipocampo dorsal de los cuatro grupos.

Se cuantificó, mediante IH, el número de neuronas positivas para el marcador AT8 de tau hiperfosforilado en la región de CA1; se obtuvieron aumentos estadísticamente significativos con respecto al grupo WT tanto en el genotipo P301S (\*:  $p < 0,05$ ) como en el Akp2/P301S (\*\*\*:  $p < 0,001$ ), sin diferencias significativas entre estos dos últimos grupos. Se presenta, además, un WB representativo con este mismo anticuerpo, AT8, y con TAU-5 para marcar la expresión total de tau; se obtuvo una sobreexpresión e hiperfosforilación de esta proteína, tanto en el ratón P301S original como en el doble Akp2/P301S, con una señal muy similar al anterior.

De este modo, los resultados obtenidos por IH y por WB son consistentes con los resultados previos descritos en esta tesis (sección 4.1.1). El ratón Akp2/P301S, a este nivel, muestra aparentemente las mismas alteraciones que el ratón P301S.

### 4.5.2 Los genotipos P301S y Akp2/P301S presentan astrogliosis en el sistema nervioso central

En la figura 4-15 se muestran las imágenes representativas y la cuantificación obtenidas mediante inmunohistoquímica en el hipocampo dorsal de los cuatro grupos.



**Figura 4–14: Sobreexpresión e hiperfosforilación de tau humana en el hipocampo dorsal de los genotipos P301S y Akp2/P301S.** Imágenes representativas y cuantificación inmunohistoquímica de las neuronas de CA1 positivas para el anticuerpo contra la proteína tau hiperfosforilada (AT8); *Western blot* representativo con dos ratones de cada genotipo empleando los anticuerpos contra tau total (TAU-5) y tau hiperfosforilada (AT8), con GAPDH como control de carga. Las cuantificaciones se han hecho con  $n$  (ratones) = 10 WT, 7 Akp2, 6 P301S y 9 Akp2/P301S; edad: 9 meses; los datos representados son los valores medios con el SEM. Barras de escala: 20  $\mu$ m; \*\*\*:  $p < 0,001$ ; \*:  $p < 0,05$ .

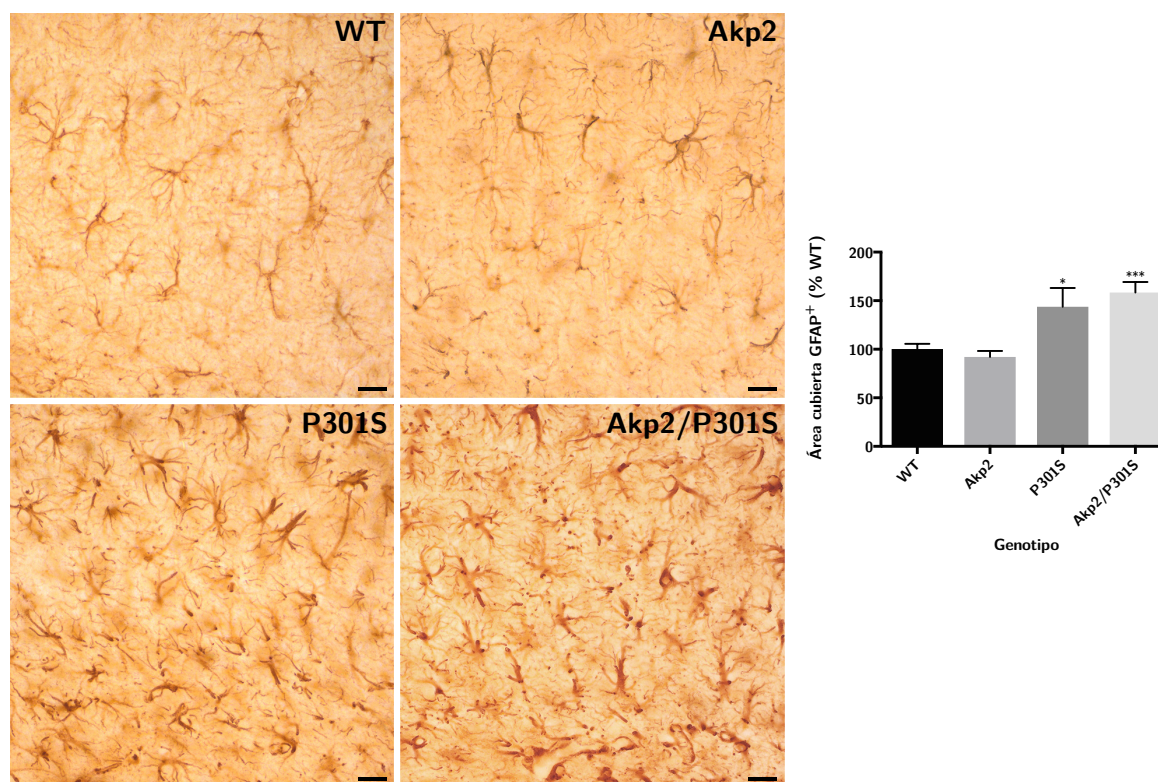
La cuantificación, realizada en este caso a partir del área ocupada por células positivas para el anticuerpo contra GFAP (astrocitos), arrojó también aumentos estadísticamente significativos con respecto al control WT tanto en el modelo P301S (\*:  $p < 0,05$ ) como en el doble Akp2/P301S (\*\*\*:  $p < 0,001$ ); entre estos dos últimos grupos, de nuevo, no se encontraron diferencias significativas.

La morfología de los astrocitos en los genotipos P301S y Akp2/P301S era claramente reactiva en comparación con los grupos control WT y Akp2, atendiendo a la clasificación descrita por la bibliografía [Pekny y Pekna, 2014].

#### 4.5.3 Los genotipos P301S y Akp2/P301S presentan microgliosis en el sistema nervioso central

Al igual que en el caso de la astrogliosis, se encontraron niveles incrementados de microglía en los genotipos P301S y Akp2/P301S realizando tinciones inmunohistoquímicas con el anticuerpo contra Iba1.





**Figura 4–15: Astrogliosis en el hipocampo dorsal de los genotipos P301S y Akp2/P301S.** Imágenes representativas y cuantificación inmunohistoquímica de los astrocitos del *stratum lacunosum moleculare* con el anticuerpo contra GFAP (conejo);  $n$  (ratones) = 10 WT, 7 Akp2, 6 P301S y 9 Akp2/P301S; edad: 9 meses; los datos representados son los valores medios con el SEM. Barras de escala: 20  $\mu$ m; \*\*\*:  $p < 0,001$ ; \*:  $p < 0,05$ .

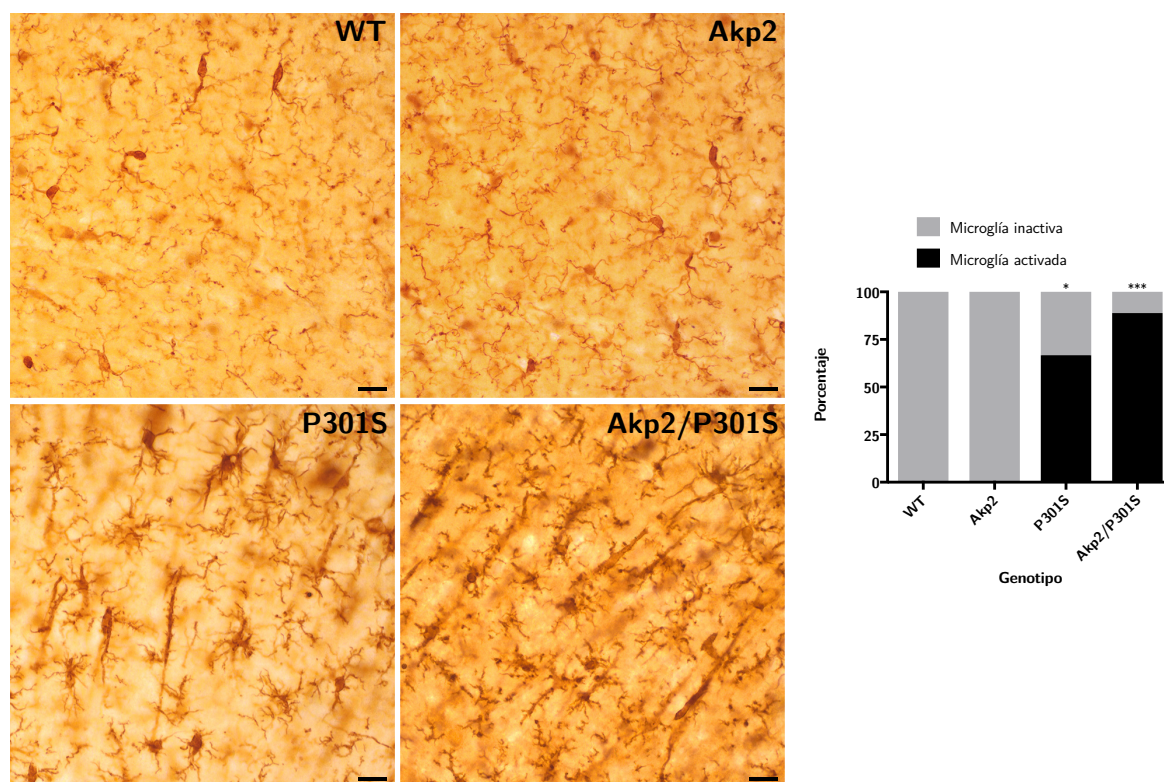
En esta ocasión, se cuantificó el porcentaje de ratones con microglía con morfología activada, bien ameboide o bien en forma de bastón (*rod microglia*); este último subgrupo, que cubría la mayor parte de los campos en aquellos ratones con microgliosis reactiva, ha sido asociado a daños neurológicos agudos [Taylor *et al.*, 2014].

En la figura 4–16 se encuentran las imágenes representativas y la cuantificación en el hipocampo dorsal de los cuatro grupos. Esta cuantificación reflejó, al igual que en los casos anteriores, aumentos estadísticamente significativos con respecto al control WT tanto en el modelo P301S (\*:  $p < 0,05$ ) como en el doble Akp2/P301S (\*\*\*:  $p < 0,001$ ); entre estos dos últimos grupos, de nuevo, no se encontraron diferencias significativas.

#### 4.5.4 Los genotipos P301S y Akp2/P301S presentan atrofia en el hipocampo dorsal

Aprovechando que en la tinción inmunohistoquímica con DAB la capa de células granulares del giro dentado queda perfectamente delimitada por la señal de fondo, se emplearon las IH con el anticuerpo AT8 para cuantificar el volumen de la GCL en los cuatro grupos; en la figura 4–17 se presentan las imágenes representativas y los resultados de dicha cuantificación.





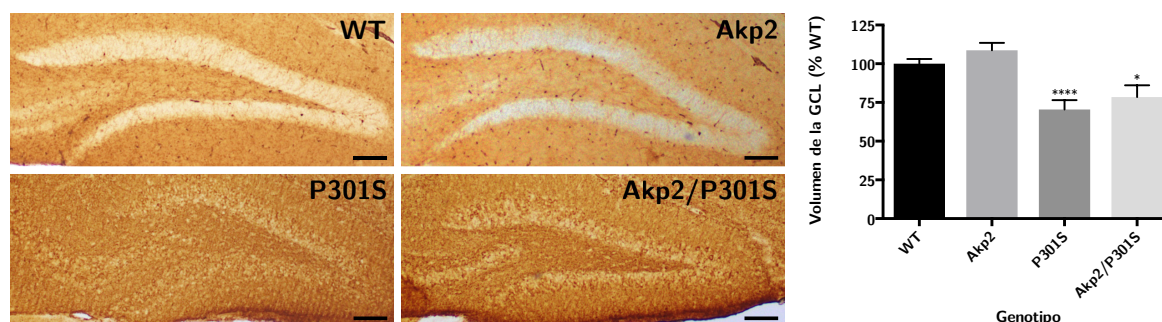
**Figura 4–16: Microgliosis en el hipocampo dorsal de los genotipos P301S y Akp2/P301S.** Imágenes representativas y cuantificación inmunohistoquímica de la microglía con morfología activada del *stratum lacunosum moleculare* con el anticuerpo contra Iba1;  $n$  (ratones) = 10 WT, 7 Akp2, 6 P301S y 9 Akp2/P301S; edad: 9 meses; las proporciones se presentan con barras apiladas. Barras de escala: 20  $\mu$ m; \*\*\*:  $p < 0,001$ ; \*:  $p < 0,05$ .

Este estudio es equivalente al realizado con DAPI en ratones P301S y WT, cuyos resultados se detallaron en la sección 4.2.2; en aquel caso se escogieron dos grupos de edades: jóvenes sin fenotipo motor, y ratones con una edad próxima al debut de este (que coincide con la edad de los grupos del presente estudio de cuatro genotipos).

De igual manera que en el anterior resultado sobre ratones P301S a la edad de la manifestación de los síntomas motores, se obtuvieron atrofas estadísticamente significativas en los ratones P301S con respecto a los WT (\*\*\*\*:  $p < 0,0001$ ).

De nuevo, siguiendo el mismo patrón que en los últimos resultados, el modelo doble Akp2/P301S mostró también el mismo fenotipo que el P301S, con una atrofia significativa en la GCL (\*:  $p < 0,05$ ) y sin diferencias significativas con el grupo P301S.

Finalmente, podemos resumir que tanto el ratón P301S como el doble Akp2/P301S presentan alteraciones hipocampales similares asociadas al proceso degenerativo en los cuatro aspectos examinados: presencia de tau hiperfosforilado, astrogliosis, microgliosis y atrofia de la capa de células granulares. En los ratones Akp2 no se hallaron diferencias significativas con respecto a los controles WT en ninguno de los parámetros analizados.



**Figura 4-17: Atrofia en el hipocampo dorsal de los genotipos P301S y Akp2/P301S.** Imágenes representativas (inmunohistoquímica empleando el anticuerpo AT8 contra tau hiperfosforilada) y cuantificación del volumen de la capa de células granulares (GCL) del giro dentado;  $n$  (ratones) = 22 WT, 7 Akp2, 16 P301S y 9 Akp2/P301S; edad: 9-10 meses; los datos representados son los valores medios con el SEM. Barras de escala: 100  $\mu$ m; \*\*\*\*:  $p < 0,0001$ ; \*:  $p < 0,05$ .

#### 4.5.5 Los genotipos P301S y Akp2/P301S presentan un aumento de células DCX<sup>+</sup> en la neurogénesis hipocampal adulta

El número de neuronas DCX<sup>+</sup> fue cuantificado por inmunohistoquímica en la zona subgranular del hipocampo dorsal, encontrándose un aumento estadísticamente significativo tanto en los ratones P301S (\*:  $p < 0,05$ ) como en el doble Akp2/P301S (\*\*:  $p < 0,01$ ); nuevamente, entre estos dos últimos grupos no se encontraron diferencias significativas.

Tal y como se comentó en el caso del modelo P301S, este dato, tomado junto a los ya expuestos relativos a la neurogénesis, sugiere un aumento de la neurogénesis hipocampal adulta en esta región en ambos grupos de ratones.

En la figura 4-18 se presenta la cuantificación de este resultado, acompañada de imágenes representativas de IH para DCX en los cuatro grupos.

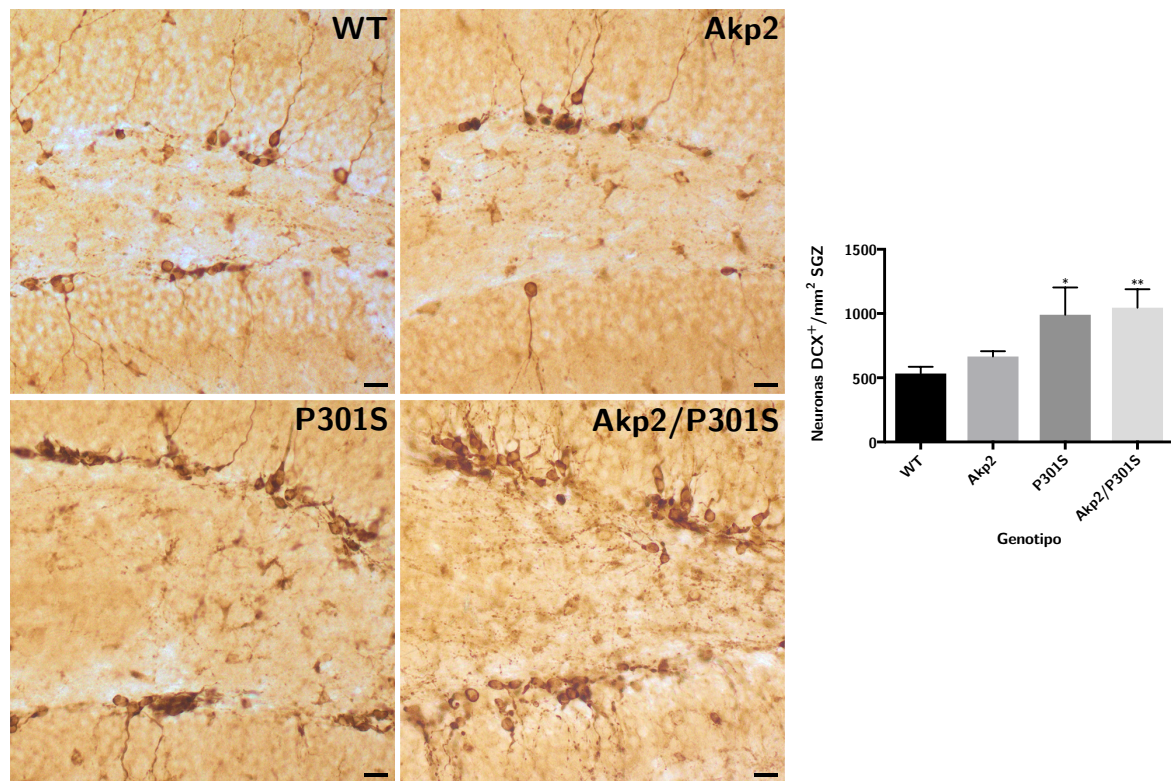
#### 4.5.6 Las variables de neurodegeneración y neurogénesis correlacionan entre sí

En este apartado se presentan cuatro análisis de regresión lineal entre los niveles de tau fosforilada (P-tau) y el resto de parámetros de los resultados de neurodegeneración de los cuatro grupos de genotipos (astrogliosis, microgliosis y volumen de la capa de células granulares), además del número de neuronas positivas para doblecortina del resultado anterior.

Las variables empleadas fueron las tratadas en los apartados previos, salvo en el caso de la microgliosis, donde se utilizó el área cubierta por células Iba1<sup>+</sup> para mantener una mayor homogeneidad con el resto de variables.

Se encontraron correlaciones sólidas en los cuatro análisis de regresión, siendo negativa la que se da con el volumen de la GCL, y positivas en los otros casos.

Las regresiones se realizaron con todos los ratones simultáneamente ( $n = 32$ ), permitiendo la visualización de la distribución de los grupos de genotipos a lo largo de los dos ejes, y de la relación global entre ambas variables en cada análisis, resumida en la recta de regresión.



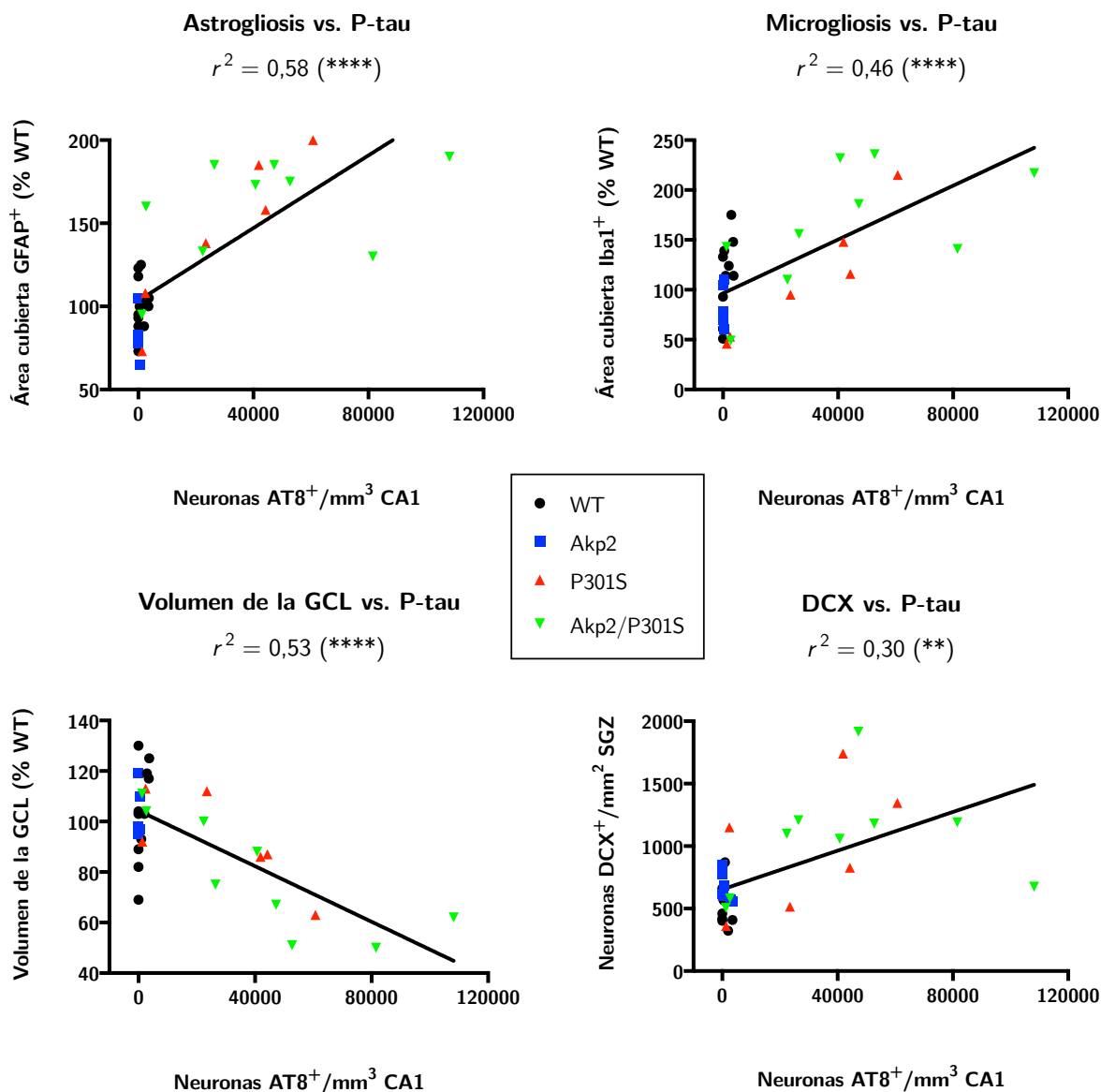
**Figura 4–18: Aumento de células DCX<sup>+</sup> en el hipocampo dorsal de los los genotipos P301S y Akp2/P301S.** Imágenes representativas y cuantificación inmunohistoquímica en la zona subgranular (SGZ) empleando el anticuerpo contra doblecortina (DCX);  $n$  (ratones) = 10 WT, 7 Akp2, 6 P301S y 9 Akp2/P301S; edad: 9 meses; los datos representados son los valores medios con el SEM. Barras de escala: 20  $\mu$ m; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*:  $p < 0,05$ .

Se escogió la variable de P-tau como independiente en todos los casos para mantener el mismo marco de referencia e ilustrar así mejor la relación entre el resto de variables dependientes.

Como puede observarse en la figura 4–19, estas visualizaciones resultan esclarecedoras de la división de los cuatro genotipos en dos subgrupos muy diferenciados. Por un lado, los ratones control WT y Akp2, que presentan una dispersión baja; por otro lado, los ratones P301S y Akp2/P301S, con una dispersión elevada y una buena correlación entre las variables medidas.

Los valores  $p$  en las correlaciones de P-tau con los otros tres valores de neurodegeneración (\*\*\*\*:  $p < 0,0001$ ) y también con DCX (\*\*:  $p < 0,01$ ) permiten asegurar con muy buena significancia estadística que estas correlaciones existen, independientemente de que el ajuste reflejado por el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) no sea excesivamente alto.

Tomados en conjunto, estos análisis, además, reafirman los resultados individuales de las variables analizadas y las conclusiones relativas a la similar afectación a nivel de hipocampo en los modelos P301S y Akp2/P301S.



**Figura 4–19: Los niveles de P-tau correlacionan positivamente con los niveles de astrogliosis, microglisis y células DCX<sup>+</sup>, y negativamente con el volumen de la capa de células granulares del hipocampo dorsal.** Se presentan los análisis de regresión lineal entre los niveles de tau hiperfosforilada (neuronas AT8<sup>+</sup>) y el área cubierta por astrocitos (GFAP<sup>+</sup>), por microglía (Iba1<sup>+</sup>), el volumen de la capa de células granulares (GCL), y el número de neuronas DCX<sup>+</sup> en la zona subgranular (SGZ). Las regresiones se efectuaron con  $n$  (ratones) = 32 (10 WT, 7 Akp2, 6 P301S y 9 Akp2/P301S); edad: 9 meses. Para los detalles de cada variable presentada, acudir a las figuras 4–14, 4–15, 4–16, 4–17 y 4–18; los análisis de regresión se realizaron sobre todos los ratones simultáneamente, y se incluyen sus coeficientes de determinación ( $r^2$ ), valores  $p$  y rectas de regresión; \*\*\*\*:  $p < 0,0001$ ; \*\*:  $p < 0,01$ .



#### 4.5.7 El genotipo Akp2/P301S revierte las alteraciones del nervio ciático del ratón P301S

En la sección 4.1.3 se introdujo el análisis inmunohistoquímico del nervio ciático acometido tras observar la parálisis del ratón P301S, especialmente intensa en las patas traseras. Dada la sobreexpresión e hiperfosforilación de tau detectadas en nuestro modelo en dicho estudio, decidimos ampliarlo con los cuatro grupos de genotipos a un análisis ultraestructural por microscopía electrónica; sus resultados aparecen detallados en la figura 4-20, con imágenes representativas de cortes transversales del nervio ciático y las principales cuantificaciones realizadas.

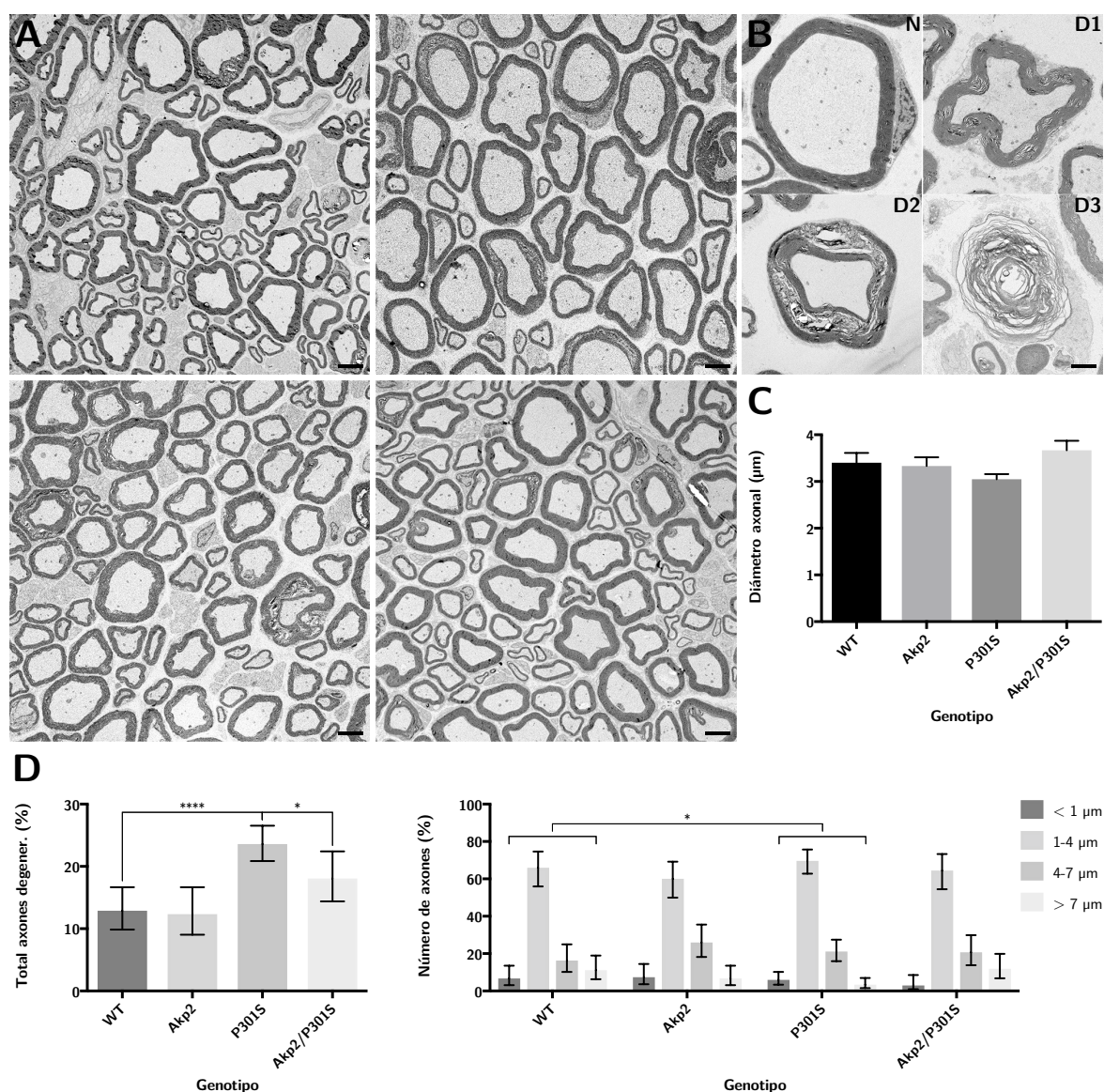
En la bibliografía existen numerosos ejemplos de asociación entre diferentes procesos neurodegenerativos, mutaciones o lesiones en el sistema nervioso central y alteraciones ultraestructurales en los nervios recubiertos de mielina. Para abordar nuestros análisis, seleccionamos los siguientes parámetros de entre los empleados con mayor frecuencia para definir y categorizar la degeneración de las fibras nerviosas mielinizadas:

- Diámetro axonal medio y distribución de calibres. Los indicadores directos más evidentes, que pueden informar de procesos degenerativos que afecten más a cierta población de fibras nerviosas según su diámetro, por ejemplo.
- Morfología de las hendiduras entre las lamelas de mielina. Estas escotaduras, llamadas incisuras de Schmidt-Lanterman, tienen una función fisiológica relacionada con el transporte entre el soma de las células de Schwann y las capas compactas de su membrana citoplasmática que forman la mielina de los nervios periféricos como el ciático, además de constituir una probable vía trófica y de comunicación axo-glial [Hoshi *et al.*, 2007]. En condiciones patológicas se ha descrito que estas incisuras aumentan en tamaño en un proceso de desmielinización asociado al desprendimiento de las lamelas hacia el axolema debido a la pérdida de axoplasma a causa de la degeneración axonal [Ghabriel y Allt, 1979a] [Ghabriel y Allt, 1979b].

La clasificación para nuestro estudio de las categorías de calibres axonales interiores y de las fases de degeneración axonal según el estado de las incisuras de Schmidt-Lanterman fue basada y adaptada de la literatura existente [Lopes *et al.*, 2016].

Con estos antecedentes, veamos a continuación los principales hallazgos de nuestros análisis por microscopía electrónica, que fueron aplicados exclusivamente a las fibras mielinizadas del nervio ciático.

Si bien algunos análisis como la cuantificación del diámetro axonal medio no arrojaron diferencias significativas en ningún caso (C), aquellos que trataron la distribución de calibres según el genotipo y, más relevante aún, la proporción de axones degenerados en cada grupo, sí mostraron diferencias estadísticamente significativas muy interesantes (D).



**Figura 4–20: El genotipo Akp2/P301S revierte las alteraciones del nervio ciático del ratón P301S.**

Análisis ultraestructural por microscopía electrónica de los axones mielinizados en cortes transversales. **(A)** Campos representativos de los ratones WT (arriba, izq.), Akp2 (arriba, der.), P301S (abajo, izq.) y Akp2/P301S (abajo, der.); barras de escala: 4 μm. **(B)** Clasificación del nivel de degeneración de la vaina de mielina axonal: N (normal), D1-D3 (degeneración creciente); barra de escala: 2 μm. **(C)** Cuantificación del diámetro axonal interior; no se encontraron diferencias significativas; los datos representados son los valores medios con el SEM. **(D)** Cuantificaciones del total de axones degenerados (D1 + D2 + D3), y de la distribución de axones según su diámetro interior; los datos representados son las respectivas proporciones, con las barras de error para los intervalos de confianza; \*\*\*\*:  $p < 0,0001$ ; \*:  $p < 0,05$ . Las cuantificaciones se han realizado con  $n$  (axones) = 135 WT, 135 Akp2, 270 P301S y 135 Akp2/P301S (diámetros y distribuciones) / 528 WT, 405 Akp2, 1204 P301S y 493 Akp2/P301S (degeneración). Las muestras fueron tomadas de 3 ratones WT, 3 Akp2, 6 P301S y 3 Akp2/P301S; edad: 9 meses.

Se hallaron diferencias significativas (\*:  $p < 0,05$ ) en las abundancias relativas de las poblaciones axonales según su diámetro interior entre el genotipo P301S y el control WT, con una menor presencia de los axones de mayor calibre en el modelo transgénico; en el resto de grupos, incluido el doble Akp2/P301S, no se encontraron diferencias significativas.

El resultado clave del análisis histopatológico del sistema nervioso periférico fue el hallazgo de diferencias estadísticamente muy significativas (\*\*\*\*:  $p < 0,0001$ ) en el total de axones degenerados del grupo P301S con respecto al control WT, pero no en el Akp2/P301S, que recuperaba un nivel de degeneración sin diferencias significativas con respecto a los WT y con diferencias (\*:  $p < 0,05$ ) con respecto al modelo P301S.

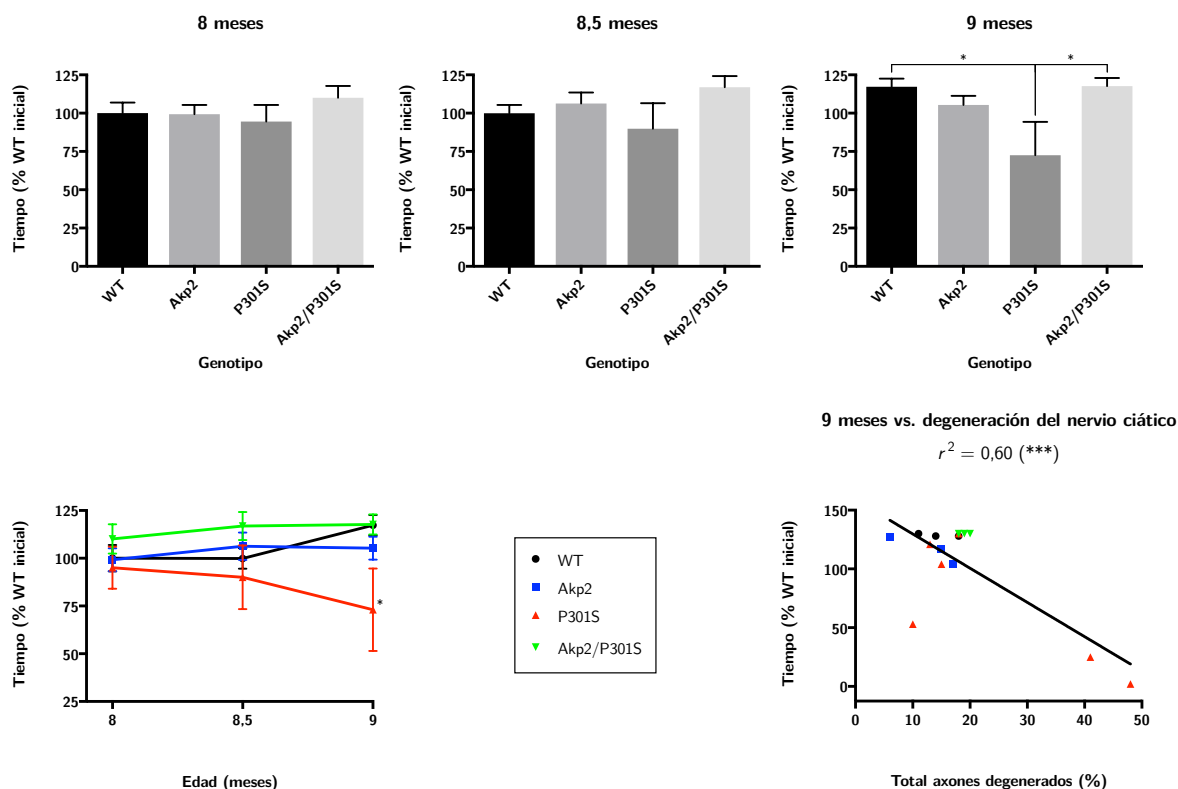
En una publicación sobre el modelo tau-P301S de Michael Goedert, con el mismo fondo genético C57BL/6J que el nuestro, pero con diferente promotor del transgén (ver la sección 1.4), se obtuvieron en médula espinal unos resultados similares [Ossola *et al.*, 2016] a los del modelo simple P301S que acabamos de exponer en nuestro estudio: la proporción de axones de mayor calibre estaba significativamente disminuida, e informaron del hallazgo (no cuantificado en su caso) de axones degenerados rodeados de mielina descompactada, conocidos habitualmente en la literatura como figuras de mielina (*myelin figures*) e identificados en nuestra clasificación como el estado D3 de degeneración axonal.

#### 4.5.8 El genotipo Akp2/P301S revierte las alteraciones motoras del ratón P301S

Paralelamente al estudio anterior, que encontró una recuperación a nivel del sistema nervioso periférico del genotipo Akp2/P301S con respecto al ratón P301S, se planteó un análisis comportamental de los mismos cuatro grupos de genotipos para evaluar su coordinación y desempeño motores a lo largo del tiempo dentro de la fase de aparición de la parálisis del modelo original. Se aplicó la prueba del rotarod en tres sesiones, separadas dos semanas entre sí y comenzando a los 8 meses de edad; en la figura 4-21 se plasman estos resultados.

A lo largo de las tres pruebas, se registró la caída en rendimiento del grupo P301S, hasta que finalmente se hallaron diferencias significativas (\*:  $p < 0,05$ ) con respecto al grupo control WT en la tercera sesión, a los 9 meses de edad; en este momento, la mitad de los seis ratones de genotipo P301S presentaba un fenotipo motor moderado o avanzado, con tiempos de latencia hasta la caída en el rotarod del 53 %, 25 % y 2 % de la media WT en la sesión a los 8 meses de edad (que es la que se estableció como tiempo base para comparar a todos los grupos en todas las edades).

Este mal rendimiento de los ratones tau-P301S en la prueba del rotarod, debido al fenotipo de parálisis motora, está también descrito en la bibliografía en los dos modelos más habituales con esta mutación de FTDP-17 en el gen *MAPT* humano (para más detalles, consultar la sección 1.4): el ratón de Michael Goedert [Scattoni *et al.*, 2010], y la línea PS19 de Virginia Lee [Vagnozzi *et al.*, 2018], que es la misma empleada por nosotros una vez homogeneizado el fondo genético.



**Figura 4–21: El genotipo Akp2/P301S revierte las alteraciones motoras del ratón P301S.** Además, existe una correlación negativa entre la latencia hasta la caída en el rotarod y el total de axones degenerados en el nervio ciático (ver la figura 4–20). Se evaluaron los cuatro genotipos en 3 pruebas de rotarod consecutivas, separadas 2 semanas entre ellas. Los resultados se muestran tanto en diagramas de barras por separado como en un diagrama conjunto de evolución temporal; se presenta también el análisis de regresión lineal entre el desempeño en el rotarod a los 9 meses y la proporción de axones degenerados. Las cuantificaciones se realizaron con  $n$  (ratones) = 9 WT, 6 Akp2, 6 P301S y 10 Akp2/P301S (8 meses de edad) / 9 WT, 6 Akp2, 6 P301S y 8 Akp2/P301S (8,5 meses) / 8 WT, 6 Akp2, 6 P301S y 9 Akp2/P301S (9 meses) / 15 (3 WT, 3 Akp2, 6 P301S y 3 Akp2/P301S; regresión). Los datos representados para el rotarod son los valores medios del tiempo de latencia hasta la caída, expresado en porcentaje del tiempo medio de los ratones WT en el primer rotarod; las barras de error muestran el SEM; el análisis de regresión se realiza sobre todos los ratones simultáneamente, y se incluye su coeficiente de determinación ( $r^2$ ), valor  $p$  y recta de regresión; \*\*\*:  $p < 0,001$ ; \*:  $p < 0,05$ .



Al igual que en el caso del análisis del nervio ciático del resultado anterior, el genotipo doble Akp2/P301S mostró una recuperación del fenotipo WT en la última prueba de rotarod, presentando un desempeño excelente —al igual que en el resto de pruebas anteriores— sin diferencias significativas con respecto a WT, y con una mejora estadísticamente significativa (\*:  $p < 0,05$ ) con respecto al modelo P301S. Ninguno de los nueve ratones de este grupo exhibía síntomas motores en el momento del sacrificio.

Dadas estas dos interesantes mejoras encontradas en el genotipo doble, decidimos realizar un análisis de regresión lineal entre las variables asociadas a ambos resultados: el tiempo de latencia hasta la caída en el rotarod a los 9 meses de edad, y el total de axones degenerados en estos mismos ratones a esa edad. El resultado, que también se puede consultar en la figura 4-21, es una correlación negativa estadísticamente muy significativa (\*\*\*:  $p < 0,001$ ).

Este último apartado muestra una recuperación fenotípica a nivel de ejecución y coordinación motoras, y correlaciona con la recuperación observada a nivel histológico en el análisis por microscopía electrónica del nervio ciático en el apartado anterior. Esta mejora a nivel del sistema nervioso periférico y a nivel comportamental motor contrasta con una ausencia aparente de recuperación en el hipocampo.

## 5 Discusión

La presente tesis se ha centrado principalmente en caracterizar, a distintos niveles, los efectos de la sobreexpresión de la proteína tau con la mutación P301S en el modelo animal de taupatía PS19, con el fondo genético homogeneizado a C57BL/6J. Dichos ratones, denominados P301S en este trabajo, expresan el cDNA del gen humano *MAPT* bajo el promotor de la proteína priónica de ratón (*Prnp*); este transgén, que codifica la mutación P301S en la isoforma con un inserto N-terminal y cuatro dominios de unión a microtúbulos (1N4R), está localizado en las coordenadas Chr3:140354280-140603283, donde causa una delección de 249 kbp que no afecta a ningún gen conocido [Goodwin *et al.*, 2019].

En este modelo de taupatía, que fue desarrollado en la Universidad de Pensilvania por el grupo de Virginia M. Lee y John Q. Trojanowski, la proteína tau humana se sobreexpresa en el sistema nervioso central; en el caso de nuestra colonia, detectamos por WB aproximadamente el triple de expresión en el hipocampo con respecto a los controles WT. De acuerdo a la literatura existente, estos ratones manifiestan una pérdida neuronal, acompañada de atrofia del hipocampo, a los ocho meses de edad; esta estructura es la principal afectada, aunque también se han descrito alteraciones en otras regiones como la corteza entorrinal y el neocórtex. La principal marca histopatológica es el desarrollo de ovillos neurofibrilares de tau hiperfosforilada en el CNS; estos han sido hallados, además de en el hipocampo, en el neocórtex, la amígdala, el tronco encefálico y la médula espinal. La activación microglial, seguida de astrogliosis, en aquellas regiones con NFT, y la ausencia total de placas seniles de A $\beta$  completan la caracterización de partida a escala histológica [Yoshiyama *et al.*, 2007]. A nivel comportamental, las características más destacables en la bibliografía son la hiperactividad motora, acompañada de una ansiedad reducida, y la parálisis, que cursa con temblores y atrofia muscular [Scattoni *et al.*, 2010] [Takeuchi *et al.*, 2011] [Xu *et al.*, 2014]. Estos déficits motores avanzan rápidamente hasta llegar a generar dificultades en la alimentación, induciendo en los ratones un fenotipo caquéxico; aproximadamente el 80 % de los animales ha muerto al llegar a los 12 meses de edad [Yoshiyama *et al.*, 2007].

La extrapolación de los resultados en modelos de sobreexpresión como este a diferentes taupatías humanas, y especialmente a la enfermedad de Alzheimer en la que no existen mutaciones en el gen *MAPT*, se fundamenta en la idea de que un incremento en los niveles de tau puede proporcionar las claves para comprender mejor la dimensión dependiente de las alteraciones de esta proteína en dichas enfermedades. Además, la forma sobreexpresada incluye en este caso la mutación patogénica P301S, documentada en pacientes de FTDP-17.

El otro modelo murino empleado es el *Akp2*<sup>+/-</sup>. Estos ratones, denominados Akp2 en el presente trabajo, son haploinsuficientes para la fosfatasa extracelular TNAP. Con el objetivo de validar esta diana enzimática para el tratamiento de taupatías como la enfermedad de Alzheimer, se cruzaron los modelos P301S y Akp2 para producir los grupos WT, Akp2, P301S y Akp2/P301S en colaboración con el laboratorio del Prof. Miguel Díaz Hernández.

En la primera parte de esta discusión repasaremos los puntos clave en la caracterización que se realizó de nuestro ratón P301S en las siguientes categorías: sobreexpresión de tau humana y neurodegeneración (tanto en el sistema nervioso central como en el periférico), pruebas comportamentales, y neurogénesis adulta. Aquí se incluirán todos los resultados de la tesis relativos a este modelo, tanto los analizados individualmente en la primera mitad como los analizados conjuntamente con el modelo Akp2 en la segunda mitad.

Finalmente, se discutirán los resultados obtenidos en las categorías anteriores con la aproximación terapéutica del modelo doble Akp2/P301S. Es en este último apartado donde se repasarán en detalle los mecanismos que motivaron el abordaje con el ratón *Akp2*<sup>+/-</sup>.

## 5.1 Sobreexpresión de tau y neurodegeneración en el CNS del ratón P301S

Dentro de este primer grupo de resultados se determinó, en animales de 10 meses de edad, que nuestro modelo P301S sobreexpresa la proteína tau transgénica en hipocampo dorsal, donde se encuentra hiperfosforilada; el anticuerpo empleado, AT8, detecta un patrón de fosforilación (Ser202/Thr205) presente en diferentes taupatías, incluyendo la enfermedad de Alzheimer [Goedert, Jakes *et al.*, 1995].

Encontramos un marcado de las fibras musgosas muy intenso, especialmente con el anticuerpo AT8 contra P-tau; esta marca histopatológica aparece en la literatura de los modelos tau-P301S con varios anticuerpos contra tau, incluyendo AT8 [Min, Chen *et al.*, 2015] [Shi *et al.*, 2017], pero no se han descrito los posibles mecanismos detrás de este fenómeno.

El estudio de proteómica tenía como principal objetivo comprobar el estado de fosforilación de la serina 301 introducida en la mutación del transgén, aspecto no tratado en la bibliografía; no se halló fosforilación en este aminoácido en el análisis por espectrometría de masas de extractos de hipocampos en animales con 7,5 meses de edad. Sí se hallaron los siguientes sitios de fosforilación: Thr181, Ser202, Thr231 y Ser404.

La acumulación de la proteína tau hiperfosforilada es una de las fuentes primarias de toxicidad, siendo un marcador útil para identificar las neuronas en fases iniciales de deterioro [Hernández, Lucas *et al.*, 2003]; de hecho, la presencia de P-tau es un acontecimiento ligado a la patología en enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer [H. Braak y E. Braak, 1991].

En este punto, nos gustaría recalcar que la toxicidad de la proteína tau transgénica en neuronas maduras hipocampales no parece estar mediada por una fosforilación adicional en el aminoácido mutante Ser301, tal y como hemos visto. Esta toxicidad podría deberse inicialmente, en buena medida, a la pérdida de afinidad de tau por los microtúbulos a causa de la mutación P301S. Se ha descrito que las mutaciones que afectan al exón 10 de la proteína tau, que codifica para el segundo dominio de unión a microtúbulos en las isoformas 4R, disminuyen la capacidad de esta proteína de promover el ensamblaje y estabilidad de estos; en concreto, la mutación P301L induce una pérdida sustancial de afinidad [Hasegawa

*et al.*, 1998] [Lewis *et al.*, 2000]. Este efecto primario favorecería la disociación de tau de los microtúbulos y su hiperfosforilación, hecho que, junto a otros factores, promovería su agregación filamentosa, alterando el metabolismo neuronal y provocando en última instancia la muerte neuronal [Hasegawa *et al.*, 1998].

En los análisis del fenotipo motor y las curvas de supervivencia Kaplan-Meier, realizados sobre nuestra colonia, se determinó que los primeros síntomas de parálisis motora aparecen a partir de los 9 meses de edad en la mayoría de los casos —hay variabilidad en el momento de este debut—, con un agravamiento entre los 10 y los 14 meses; la mediana de supervivencia fue de 11,7 meses, con grandes diferencias con respecto a la supervivencia de los controles WT. Esta supervivencia es sensiblemente mayor (un 30 % más elevada) que en la línea PS19 original de Virginia Lee [Yoshiyama *et al.*, 2007]; las diferencias en los fondos genéticos (B6C3F1 en la PS19, C57BL/6J en nuestra colonia) podrían estar detrás de esta variación.

Teniendo en cuenta la disminución del volumen hipocampal descrito en la bibliografía sobre estos modelos, quisimos comprobar si sucede lo mismo específicamente en el giro dentado, uno de las pocas regiones donde tiene lugar la neurogénesis adulta. Efectivamente, en los ratones de 11 meses, dentro de la edad de empeoramiento de los síntomas motores, registramos una atrofia de la capa de células granulares del giro dentado del hipocampo dorsal; no fue así en los ratones jóvenes de 2,5 meses, donde no se hallaron diferencias con respecto a los controles WT. Junto a esta atrofia en el DG del hipocampo, encontramos la muerte celular —medida a través del número de células positivas para caspasa-3 truncada— aumentada en el conjunto del hipocampo dorsal a los 9 meses de edad.

Estos datos sugieren que, durante los primeros meses de vida, la sobreexpresión de tau no estaría induciendo una atrofia hipocampal por una o varias de las siguientes razones: todavía no se dan las condiciones neurotóxicas en esta región como para desencadenar una muerte neuronal generalizada, no se ha acumulado un número suficiente de neuronas perdidas como para hacer significativa la atrofia, o bien porque esta muerte estaría siendo compensada en la GCL por un aumento en la neurogénesis adulta que, una vez avanzada la edad el ratón, sería ya incapaz de contrarrestar la neurodegeneración. Este punto se discute en profundidad en la sección 5.4.

Finalmente, se hallaron tanto astrogliosis como microgliosis en el hipocampo dorsal de animales P301S de 9 meses de edad, con morfologías reactivas en ambos casos; dentro del análisis de la microgliosis, fue muy común la presencia de la morfología en bastón (*rod microglia*), vinculada a lesiones neurológicas agudas [Taylor *et al.*, 2014].

## 5.2 Sobreexpresión de tau y neurodegeneración en el PNS del ratón P301S

Las taupatías se caracterizan no solo por los déficits cognitivos, sino también por los motores, asociados a la alteración del metabolismo de la proteína tau en el cerebro, el tronco encefálico y la médula espinal; dentro de esta familia de dolencias, las mutaciones en la posi-

ción cromosómica 17q21 incluidas dentro de la demencia frontotemporal con parkinsonismo asociada al cromosoma 17 (FTDP-17) conllevan importantes trastornos del movimiento.

Empleando nuestro modelo de ratón P301S, teniendo en cuenta que su parálisis motora es especialmente intensa en las extremidades posteriores, decidimos investigar el estado de su nervio ciático para comprender si estos déficits motores se deben no solo a la acumulación en el sistema nervioso central de la proteína tau humana mutante, sino también a alteraciones inducidas directamente por la expresión del transgén en el sistema nervioso periférico. Realizamos tres tipos de estudios: de inmunohistoquímica, de *western blot*, y de microscopía electrónica; estos análisis fueron llevados a cabo a edades comprendidas entre los 9 y los 11 meses.

En una primera aproximación, observamos mediante IH y WB que la proteína tau transgénica está sobreexpresada en el nervio ciático de los animales, revelando que tau-P301S, bajo el promotor de *Prrnp* murino, está presente en esta estructura, y sugiriendo que algunos de los problemas motores podrían deberse a este hecho. A partir de una inmunohistoquímica de gran aumento, determinamos que esta expresión se restringe a los axones del nervio ciático, no detectándose tau-P301S en las vainas de mielina conformadas por las células de Schwann. Además, la proteína transgénica está fosforilada, al igual que en el caso del CNS, en el epítipo reconocido por el anticuerpo AT8: los aminoácidos Ser202 y Thr205.

El estudio central del nervio ciático fue el análisis por microscopía electrónica, en el que se hallaron alteraciones en el modelo P301S. Se detectó una mayor cantidad de axones con descompactación de las incisuras de Schmidt-Lanterman en el modelo P301S, con diferencias estadísticamente muy significativas con respecto a los controles WT. Se encontraron, además, diferencias en las distribuciones axonales de acuerdo al calibre, con menor cantidad de las fibras de mayor diámetro en los ratones transgénicos.

Las alteraciones observadas en la mielina de las células de Schwann en el nervio ciático de los ratones P301S podrían implicar un papel crucial de este nervio del PNS en su fenotipo motor, dado que el proceso de desmielinización está vinculado a la propia degeneración axonal, al inducirse el desprendimiento de las lamelas a causa de la retracción axonal provocada por la pérdida del axoplasma [Ghabriel y Allt, 1979a] [Ghabriel y Allt, 1979b]; por esta razón, este indicador ultraestructural fue identificado con el estado de degeneración del axón.

En la bibliografía previa, los mecanismos subyacentes a las alteraciones motoras no se entienden completamente en los ratones PS19; tan solo se ha sugerido, de forma muy vaga, que estos problemas pueden deberse a la expresión del transgén en la médula espinal [Yoshiyama *et al.*, 2007]. Curiosamente, se han descrito déficits motores y alteraciones de la mielina en el nervio ciático similares a los encontrados en nuestro estudio en ratones *knockout* para tau [Lopes *et al.*, 2016], ratones con tau que carece del exón 10 [Gumucio *et al.*, 2013], así como ratones que sobreexpresan la isoforma 0N4R de tau con la misma mutación P301S, pero bajo el promotor de *Thy1.2* [Yin *et al.*, 2017]. Por tanto, parece que se pueden observar

alteraciones fenotípicas similares en modelos animales con niveles de expresión de tau tanto bajos como altos, lo que sugiere que es necesario un nivel adecuado de esta proteína en el nervio ciático para su funcionamiento fisiológico normal.

En estos estudios, al igual que en el caso de nuestro modelo, los déficits motores aumentan con la edad de los animales; por otro lado, se ha descrito un aumento en los niveles de la proteína tau en el nervio ciático de animales viejos, relacionándolo con mecanismos deteriorados de transporte axonal y recambio de proteínas [Krishnan *et al.*, 2016]. El transporte axonal en el nervio ciático se ve alterado en ratones *knockin* que expresan la proteína mutante tau-P301L [Adalbert *et al.*, 2018], así como en un modelo murino con tau humana con la mutación K369I [Ittner, Fath *et al.*, 2008]; curiosamente, este último ratón no manifiesta signos degenerativos en esta estructura.

Las alteraciones en el transporte axonal también pueden desencadenar un mecanismo que conduce a la denervación de la unión neuromuscular. Este fenómeno no ha sido estudiado en nuestro modelo murino PS19, pero sí en el modelo Tau 58/4, que incluye la mutación P301S bajo el promotor de *Thy1.2*, y donde se observó esta denervación neuromuscular desde los 9 meses de edad [Yin *et al.*, 2017]. También ha sido descrito este proceso en el modelo Tg30, que presenta dos mutaciones de FTDP-17: G272V y P301S; aquí se observó, además, la aparición de esferoides axonales y la acumulación axonal de orgánulos citoplasmáticos y neurofilamentos en la médula espinal, además del aumento de la cantidad de orgánulos degradados en los axones del nervio ciático [Audouard *et al.*, 2015]; estas anomalías ultraestructurales eran indicativas de deterioro en los transportes axonales. La creciente evidencia sugiere que la disfunción neuronal resultante del fracaso del transporte axonal es un mecanismo patológico importante en la neurodegeneración, incluida la asociada a la enfermedad de Alzheimer [Roy *et al.*, 2005] [Stokin y Goldstein, 2006].

Teniendo en cuenta nuestros datos, es necesario preguntarse si los efectos tóxicos de la proteína tau transgénica en el sistema nervioso periférico de nuestro modelo P301S se deben simplemente al aumento de los niveles de tau, a su mutación patogénica, y/o porque la isoforma del CNS (sin el exón 4A) es más tóxica o puede reemplazar a la isoforma exclusiva del PNS, denominada *big tau* (con el exón 4A); refiriéndonos a esta última posibilidad, nuestros datos no permiten saber si existe un control de los niveles endógenos de tau, ya sea a nivel de la transcripción, de la traducción o de la degradación.

Resumiendo este apartado, hemos establecido que la parálisis y la muerte subsiguiente observada en nuestro modelo P301S pueden deberse no solo a la degeneración que tiene lugar en diferentes estructuras del sistema nervioso central, sino también a las alteraciones detectadas en el periférico; en particular, los daños en el nervio ciático, en los que la proteína tau transgénica sobreexpresada localmente probablemente esté implicada, pueden jugar un papel crucial en el fenotipo motor observado. Teniendo en cuenta que el ratón PS19 es muy usado para el estudio de las taupatías, nuestros resultados sugieren que, para la evaluación de este modelo, es relevante el análisis de su PNS, especialmente del nervio ciático.

### 5.3 Pruebas comportamentales en el ratón P301S

En la prueba de campo abierto, nuestra colonia P301S mostró la hiperactividad esperada, con bajos niveles de ansiedad, en todos los parámetros analizados a la edad de 9,5 meses.

En la prueba del laberinto acuático de Morris, a los 5,5 meses de edad, no se encontraron diferencias significativas ni en las curvas de entrenamiento —a pesar de que el rendimiento de los P301S cada día fue peor que en el caso de los WT— ni en la prueba final de la sonda: nuestros ratones P301S aprendieron correctamente la tarea, y recordaron el emplazamiento de la plataforma invisible el último día sin diferencias significativas con respecto a los controles WT. En este sentido, nuestro estudio se alinearía con aquellos que tampoco han encontrado diferencias en el desempeño de modelos murinos P301S en pruebas de memoria y navegación espacial como el laberinto acuático de Morris [Scattoni *et al.*, 2010] [Xu *et al.*, 2014] o el laberinto circular de Barnes [Takeuchi *et al.*, 2011].

Tras el resultado anterior, quisimos comprobar si ese buen rendimiento en habilidades dependientes del hipocampo a edades intermedias se mantenía en una edad más avanzada, ya durante el período de comienzo del declive motor. Decidimos aplicar la prueba de preferencia de nueva posición, que no ha sido empleada con modelos tau-P301S; en este caso, a los 9,5 meses de edad. Esta prueba evalúa la capacidad de discriminar entre contextos similares, que depende de la actividad del giro dentado; la neurogénesis adulta hipocampal ha sido ligada a esta habilidad y, a nivel más general, con la integración y separación de patrones durante el aprendizaje, siendo las nuevas neuronas generadas importantes en la codificación de eventos nuevos [Deng *et al.*, 2010] [Sahay *et al.*, 2011] [Aimone *et al.*, 2011]; dado que el proceso de neurogénesis adulta también es analizado en el presente trabajo, la prueba de NLP nos permite valorar sus consecuencias a nivel comportamental. Nuestro modelo animal P301S reconoció satisfactoriamente la pieza que había cambiado de posición (casi el 70 % de las exploraciones, sin diferencias significativas con respecto a los controles WT) en dicha prueba; este resultado, junto al obtenido en la prueba del MWM, sugiere un correcto mantenimiento de la función hipocampal, a pesar de la neurodegeneración observada en esta estructura (la neurogénesis adulta, que será discutida a continuación, puede ser la clave para resolver esta aparente contradicción). Al igual que en la prueba de OF previa, los parámetros de hiperactividad indicaron un aumento significativo en los ratones P301S.

Con respecto al rendimiento motor de nuestro modelo P301S, se aplicaron tres pruebas de rotarod consecutivas al mismo grupo de ratones durante la ventana de edad de la aparición de los primeros síntomas de parálisis: entre los 8 y los 9 meses. Se pudo registrar con claridad el inicio de los problemas en la coordinación y ejecución motoras de estos ratones, que alcanzó diferencias significativas con respecto a los WT en la última sesión, a los 9 meses, coincidiendo con los daños detectados en el nervio ciático a esta edad discutidos previamente. En la literatura sobre varios modelos de tau-P301S con diferentes promotores se han obtenido resultados similares en esta prueba [Scattoni *et al.*, 2010] [Vagnozzi *et al.*, 2018].



## 5.4 Neurogénesis adulta en el ratón P301S

Para estudiar los efectos de la sobreexpresión de tau-P301S en la neurogénesis adulta del hipocampo dorsal se analizó, en primer lugar, en qué momento de esta se inicia la expresión del transgén, que se encuentra bajo el promotor *Prnp* murino; estos análisis se realizaron a la edad de 10 meses. Los estudios de colocalización con marcadores de las distintas etapas, desde los precursores iniciales hasta las neuronas maduras totalmente integradas en el circuito hipocampal, indicaron que la expresión de la proteína tau mutante se inicia en una fase tardía del proceso, cuando los neuroblastos son positivos para calbindina. Desde que se generan a partir de los progenitores, las nuevas neuronas tardan unas cuatro semanas en empezar a expresar este marcador en ratones [Kempermann, Kuhn *et al.*, 1997]; de este modo, establecemos que el promotor *Prnp* bajo el que se expresa tau-P301S en nuestro modelo solo es activo a partir de dichas edades en la neurogénesis adulta. La expresión del transgén se mantendrá activa durante el resto de la vida de las neuronas, tal y como se deduce de la presencia de tau humano (células HT7<sup>+</sup>) en las neuronas granulares maduras del giro dentado y en regiones no neurogénicas del resto del hipocampo.

El inicio de la expresión del transgén en la neurogénesis adulta de un modelo P301S no se había descrito antes, y coincide con los resultados sobre la proteína cuyo promotor emplea, la priónica murina (*Prnp*), que tiene una expresión tardía en las nuevas neuronas dentro de este proceso [Steele *et al.*, 2006].

A continuación, se cuantificó la neurogénesis adulta en esta región empleando marcadores de etapas intermedias/finales: doblecortina y calretinina; estos análisis fueron ejecutados a edades muy próximas a los 10 meses del estudio anterior. En ambos casos se obtuvo en nuestro modelo transgénico un incremento en el número de células positivas para dichos marcadores. Dado que se repitió la diferencia significativa con respecto a los controles WT tanto en células DCX<sup>+</sup> como en Calr<sup>+</sup>, y que la calretinina representa la etapa previa a la madurez total, podemos considerar que la neurogénesis hipocampal adulta se encuentra aumentada en nuestro modelo P301S, y que este incremento se mantiene hasta el final del proceso neurogénico. Serían necesarios estudios de análogos de timidina, como BrdU, CldU o IdU, a distintos puntos temporales a lo largo de este proceso, para confirmar este último punto.

Dentro de la literatura, tanto en modelos murinos como en pacientes humanos, los estudios acerca de los efectos sobre la neurogénesis adulta de enfermedades neurodegenerativas o lesiones neurológicas arrojan resultados aparentemente contradictorios, con diferencias significativas tanto hacia un aumento como hacia una disminución, o sin hallazgo de cambios en otros casos (para una revisión, ver [Wirths, 2017]). El ejemplo quizás más cercano a nuestro estudio —que es novedoso en un modelo con tau-P301S— es el llevado a cabo en un ratón con tau-P301L bajo el promotor de *Thy1.2*, donde no se encontraron diferencias significativas en las cuantificaciones estereológicas de los siguientes marcadores: Ki-67 (etapas iniciales de



proliferación), doblecortina (etapas intermedias) ni BrdU (sacrificando a las 4 semanas de la inyección) [Boekhoorn *et al.*, 2006].

El aumento en la neurogénesis adulta puede suceder a través de varios mecanismos; los principales son dos: aquellos que conllevan un aumento de la proliferación, y aquellos que implican una disminución de la apoptosis [Komuro *et al.*, 2015]. Como hemos discutido previamente, tal y como analizamos a través de la caspasa-3 truncada, la muerte celular se encuentra aumentada de manera general en la región hipocampal en nuestro modelo P301S; este aumento de la apoptosis ocurre también en la GCL, que, de hecho, está atrofiada como hemos visto. Por lo tanto, todos nuestros resultados apuntan a un aumento en la proliferación de los precursores neuronales como causa de la neurogénesis adulta incrementada; para confirmarlo con seguridad, sería necesario un nuevo estudio empleando análogos de timidina y sacrificio a las 24 h, o bien marcadores de etapas proliferativas como fosfo-histona H3 o Ki-67.

Teniendo en cuenta que el transgén no se expresa en estos estadios proliferativos del proceso de neurogénesis adulta, dicho incremento no puede deberse a la expresión endógena de la proteína tau humana en los precursores neuronales. Estaríamos, por tanto, ante un efecto indirecto, probablemente en respuesta al daño inducido por la sobreexpresión de tau-P301S en el giro dentado, que conlleva, como hemos visto, una hiperfosforilación de esta proteína, la presencia de glía reactiva, una apoptosis incrementada y la atrofia de esta estructura.

El ambiente inflamatorio desencadenado por esta sobreexpresión podría ser determinante en la alteración de la neurogenesis adulta que observamos en nuestro modelo. Así, se ha observado que la neuroinflamación afecta a la neurogénesis hipocampal adulta teniendo o bien consecuencias perjudiciales, o bien beneficiosas en este proceso (para una revisión, ver [Fuster-Matanzo, Llorens-Martín, Sirerol-Piquer *et al.*, 2013]); el resultado final depende en gran medida de cómo se activan la microglía, macrófagos y/o astrocitos en estas circunstancias [Russo *et al.*, 2011], y el equilibrio que se da entre los efectos negativos y los positivos. La interacción entre la señalización inflamatoria y los precursores neuronales tendrá un profundo impacto en la homeostasis del sistema nervioso central y en la eficiencia de los mecanismos de reparación puestos en marcha [Martino y Pluchino, 2007]; este campo de estudio es de gran importancia en el contexto de los trastornos neurodegenerativos.

Es posible que las alteraciones observadas sobre la neurogénesis adulta estén mediadas también por otros efectores. Así, la proteína tau-P301S bajo el promotor de *Thy1.2* se ha asociado a la sobreexpresión de inhibidores de CDK como son p21 y p27 [Delobel *et al.*, 2006]; de hecho, esta mutación desencadena cambios en la regulación de las ciclinas, induciendo una parada de ciclo en G2 y M [Z. Zhao *et al.*, 2003]. A pesar de ello, en ese modelo no se llegaron a detectar modificaciones significativas en la neurogénesis adulta [Boekhoorn *et al.*, 2006].

Como siguiente paso, nos propusimos analizar si en nuestro modelo P301S existía alguna alteración en la morfología del árbol dendrítico de las nuevas células procedentes del proceso de neurogénesis adulta en la SGZ; para ello, se inyectaron retrovirus que expresan la proteína

PSD95 fusionada con GFP en el giro dentado de animales de 8 semanas de edad, sacrificándolos 8 semanas después. Las neuronas marcadas que se analizaron, por tanto, procedían de precursores en división en el momento de la inyección estereotáxica, y que ya estaban totalmente integradas en el circuito sináptico hipocampal en el momento del sacrificio; la edad de los ratones en el proceso (desarrollado entre los 2 y los 4 meses) debía ser temprana para que la alta neurogénesis garantizara un número suficiente de neuroblastos infectados para el análisis. No se observaron diferencias significativas con respecto a las nuevas neuronas de los ratones WT en ninguno de los parámetros estudiados: la longitud dendrítica total, la longitud de la dendrita primaria (la que emerge directamente desde el soma, hasta su bifurcación), el porcentaje de neuronas con más de una dendrita primaria, y el análisis de Sholl de la arborización dendrítica.

No existen estudios previos sobre la morfología dendrítica en la neurogénesis adulta en la bibliografía de modelos con tau-P301S. Hay estudios similares al nuestro, por ejemplo, en el ratón VLW con tres mutaciones asociadas a la FTDP-17, incluyendo la P301L; en aquel ratón sí se hallaron alteraciones en varios de los parámetros [Terrerós-Roncal *et al.*, 2019]. A este respecto, debemos destacar también que se han observado algunos de estos cambios en neuronas granulares (no procedentes de neurogénesis adulta) en pacientes humanos de AD, empleando la tinción de Golgi [Llorens-Martín *et al.*, 2013].

Finalmente, queremos resaltar unas cuantas ideas clave de este apartado. Hemos establecido que nuestro modelo P301S presenta una expresión tardía del transgén en el proceso de la neurogénesis adulta en el hipocampo dorsal, y la cuantificación de los precursores neuronales generados en la zona subgranular del giro dentado evidenció un aumento significativo tanto en los neuroblastos DCX<sup>+</sup> como en los Calr<sup>+</sup>; estas neuronas, a la vista del análisis morfológico realizado, desarrollan árboles dendríticos sin diferencias significativas con respecto a aquellos de los ratones WT (por lo menos, a edades tempranas/intermedias). Teniendo en cuenta los daños neurodegenerativos que hemos medido en el hipocampo, incluyendo una sobreexpresión e hiperfosforilación de tau, astrogliosis y microgliosis, apoptosis celular aumentada, y una atrofia del giro dentado, este aumento de la neurogénesis se podría enmarcar en un mecanismo de compensación, descrito como posible función de reemplazo de las pérdidas producidas por diferentes patologías neurodegenerativas, por ejemplo en pacientes con la enfermedad de Alzheimer [Jin, Peel *et al.*, 2004]. Nuestros ratones P301S, a pesar de manifestar los síntomas motores en pruebas como el rotarod, mantienen un rendimiento sin diferencias significativas con respecto a los controles en pruebas de memoria y navegación espacial dependientes de hipocampo (laberinto acuático de Morris y preferencia de nueva posición), lo que sugiere que este posible mecanismo de compensación a partir de las nuevas neuronas generadas en la SGZ en mayor número, e integradas en los circuitos hipocampales con morfologías dendríticas aparentemente normales, podría estar contrarrestando los efectos neurotóxicos inducidos por la sobreexpresión de tau-P301S en esta región. De hecho, la prueba de NLP está estrechamente relacionada con el proceso de neurogénesis adulta que

ocurre en el hipocampo [Deng *et al.*, 2010] [Sahay *et al.*, 2011] [Aimone *et al.*, 2011], y se ha evidenciado que una disminución de esta neurogénesis inducida por agentes citostáticos afecta al rendimiento en dicha prueba, así como a la memoria espacial reciente y a largo plazo medidas en el MWM [Goodman *et al.*, 2010].

Nuestros resultados son especialmente interesantes en el contexto de la enfermedad de Alzheimer, la taupatía de mayor prevalencia, pues recientemente se ha descrito que, en el ser humano, la neurogénesis adulta hipocampal continúa activa hasta edades muy avanzadas, pero presenta una disminución significativa en pacientes con esta enfermedad [Moreno-Jiménez *et al.*, 2019] (aunque, como hemos discutido previamente, otros estudios apuntan a un aumento compensatorio de la neurogénesis [Jin, Peel *et al.*, 2004]). En la FTDP-17, a la que pertenece la mutación en *MAPT* de nuestro modelo, la neurogénesis adulta no ha sido estudiada aún en pacientes humanos.

## 5.5 El ratón *Akp2/P301S* como modelo genético terapéutico

Como se ha discutido previamente, la hiperfosforilación de la proteína tau se encuentra entre los primeros eventos que desencadenan la toxicidad y posterior muerte neuronal en las taupatías, tanto en pacientes humanos como en modelos animales, incluyendo el nuestro. Esta fosforilación resulta de un equilibrio entre la acción de quinasas y fosfatasa de tau [Avila, 2008]; el papel de estas quinasas, como la GSK-3 $\beta$ , está bien documentado en la literatura [Hernandez *et al.*, 2013], pero no tanto la función de las fosfatasas de esta proteína [Gong *et al.*, 1993], aunque, en el campo de la enfermedad de Alzheimer, ha sido discutido extensamente [F. Liu, Liang *et al.*, 2006]. La fosfatasa más importante implicada en la desfosforilación de tau es la PP2A, que representa más del 70 % de la actividad fosfatasa total encontrada en el cerebro humano [F. Liu, Grundke-Iqbal *et al.*, 2005]; esta proteína, y la mayoría de las fosfatasas estudiadas en el ámbito de las taupatías, son enzimas intracelulares.

En este trabajo hemos realizado una aproximación diferente que ha consistido en estudiar el efecto de una fosfatasa extracelular, la fosfatasa alcalina no específica de tejido (TNAP; gen *ALPL* en humanos, *Akp2* en ratones). Previamente nuestro grupo ha propuesto que dicha exoenzima desempeña un papel clave en la propagación de la neurodegeneración en taupatías como la enfermedad de Alzheimer; así, Díaz Hernández y otros han descrito que la TNAP anclada a la membrana celular es capaz de desfosforilar la proteína tau en el medio extracelular [Diaz-Hernandez *et al.*, 2015]; una vez desfosforilada, tau se comporta como un agonista de los receptores muscarínicos M1 y M3, pero con propiedades farmacológicas diferentes a la activación mediante acetilcolina: se induce un aumento sostenido de calcio intracelular en la neurona receptora que finalmente altera su homeostasis y desencadena la muerte neuronal [Gómez-Ramos, Díaz-Hernández *et al.*, 2008] [Díaz-Hernández *et al.*, 2010]. De hecho, la expresión y la actividad de la TNAP se han hallado incrementadas en

cultivos primarios neuronales tras la adición de tau desfoforilado [Díaz-Hernández *et al.*, 2010], sugiriendo un ciclo de retroalimentación positiva por el cual la TNAP es activada por el propio producto que genera. También ha sido descrita una correlación negativa entre la actividad de la TNAP y las funciones cognitivas en pacientes con AD [Vardy *et al.*, 2012], lo que sugiere que esta proteína puede estar involucrada en el proceso neurodegenerativo de esta y otras taupatías.

Estos resultados sobre el efecto de las enzimas extracelulares en patologías de tau como la enfermedad de Alzheimer son especialmente relevantes a la luz de la hipótesis que está cobrando fuerza en los últimos años para muchas enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la AD, de que la propagación de proteínas patogénicas a través de las estructuras cerebrales juega un importante papel en el avance de estas dolencias [Duyckaerts *et al.*, 2019].

En esta tesis hemos llevado a cabo una aproximación genética para comprobar si una disminución en la actividad TNAP puede revertir o retrasar la aparición del fenotipo y alteraciones detectadas en nuestros ratones transgénicos que sobreexpresan tau-P301S, al actuar atenuando el citado ciclo de retroalimentación positiva e interfiriendo a nivel extracelular en la propagación de tipo priónico de la patología asociada a tau.

Para ello, cruzamos estos ratones P301S con ratones haploinsuficientes para la enzima TNAP, *Akp2*<sup>+/-</sup> (los ratones KO, *Akp2*<sup>-/-</sup>, mueren antes del destete); las cuatro combinaciones posibles de genotipos se denominaron de la siguiente manera: WT, *Akp2*, P301S y *Akp2*/P301S. Debido a que nuestro modelo de taupatía comienza a presentar déficits motores a partir de los 9 meses, todos los estudios se llevaron a cabo alrededor de esta edad.

A continuación discutiremos los resultados obtenidos en el genotipo doble *Akp2*/P301S en comparación con el grupo control WT y el modelo P301S. A pesar de que los ratones KO (*Akp2*<sup>-/-</sup>) desarrollan en los primeros días posnatales síntomas neurológicos severos, incluyendo ataques epilépticos, disfunciones sinápticas y alteraciones en la mielina del sistema nervioso central [Hanics *et al.*, 2012], nuestros ratones *Akp2* (*Akp2*<sup>+/-</sup>) no tuvieron diferencias significativas con respecto al grupo WT en ninguna de las áreas estudiadas, aumentando nuestra confianza en un efecto específico de la haploinsuficiencia sobre la patología de nuestro modelo transgénico.

El primer grupo de resultados se dedicó a la neurodegeneración en el sistema nervioso central. El análisis inmunohistoquímico y bioquímico del hipocampo reveló que los ratones *Akp2*/P301S manifestaban los mismos daños que el modelo P301S —no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los parámetros estudiados—, con diferencias estadísticamente significativas con respecto a los ratones WT en sobreexpresión e hiperfosforilación de tau, astrogliosis, microgliosis y atrofia del giro dentado.

A continuación, se cuantificó el estado de la neurogénesis adulta en el hipocampo dorsal a través del marcador doblecortina. De nuevo, tanto el grupo P301S como el *Akp2*/P301S presentaban un aumento significativo del número de neuroblastos DCX<sup>+</sup> con respecto a los controles WT, pero sin diferencias significativas entre ellos.

Finalmente, decidimos analizar el sistema nervioso periférico de los cuatro grupos a nivel ultraestructural mediante un estudio de microscopía electrónica del nervio ciático; así mismo, complementamos dicho análisis con una batería de pruebas comportamentales de coordinación y ejecución motoras (rotarod) sobre los mismos ratones a lo largo del período de aparición del fenotipo motor del modelo P301S.

Frente a las diferencias significativas con respecto a los controles WT obtenidas en los ratones P301S tanto en el análisis del nervio ciático (aumento de los axones degenerados y reducción de la proporción de axones de mayor calibre) como en el rotarod (reducción del rendimiento a los 9 meses de edad), que ya han sido discutidas en apartados anteriores, el modelo doble Akp2/P301S no mostró ninguna de estas diferencias, recuperando el fenotipo del control WT y mostrando mejoras estadísticamente significativas con respecto al modelo P301S.

En este punto querríamos comentar que, aprovechando todos los experimentos ejecutados con los cuatro grupos en las distintas áreas mencionadas, decidimos realizar análisis de regresión lineal entre las variables de neurodegeneración del CNS y de neurogénesis, así como entre la degeneración del PNS y el rendimiento en el rotarod. Se obtuvieron correlaciones estadísticamente muy significativas en todos los casos: a mayor hiperfosforilación de tau en el hipocampo, mayor astrogliosis, microgliosis, atrofia de la GCL, y mayor cantidad de neuroblastos DCX<sup>+</sup>; y, a mayor degeneración axonal en el nervio ciático, peor rendimiento en la prueba del rotarod. Estos resultados conjuntos refuerzan los obtenidos individualmente, y permiten contrastar experimentalmente las interrelaciones entre las distintas fases neurodegenerativas y la neurogénesis adulta descritas con detalle en el apartado anterior, consolidando la hipótesis del mecanismo compensatorio en este último proceso.

Para finalizar, conviene interpretar brevemente los resultados obtenidos por el ratón doble Akp2/P301S. Por un lado, la afectación a nivel de hipocampo es equivalente a la del modelo P301S, con numerosos parámetros indicando neurodegeneración como son la hiperfosforilación de tau, la gliosis, la atrofia del giro dentado, y una neurogénesis aumentada como posible mecanismo compensatorio. Por otro lado, los daños a nivel de nervio ciático y el mal rendimiento en la prueba motora del rotarod del modelo original P301S son revertidos en el genotipo Akp2/P301S, no encontrándose ninguno de los ratones de su grupo con fenotipo de afectación motora en el momento del sacrificio a los 9 meses de edad, frente al 50 % de los individuos P301S con parálisis moderada o avanzada; de hecho, en un estudio preliminar del que no incluimos los datos en esta tesis, el grupo de ratones Akp2/P301S ha mostrado una supervivencia aumentada con respecto al genotipo P301S.

El equipo que generó la línea PS19 de la que derivan nuestros ratones P301S realizó una descripción minuciosa de la evolución espacio-temporal de la patología asociada a tau (más concretamente, de la presencia de NFT) en el cerebro de este modelo murino, destacando sus paralelismos con las etapas establecidas por Braak y otros para la progresión de los agregados de tau en el cerebro de pacientes humanos de AD [Hurtado *et al.*, 2010]:

- Estadio I: corteza entorrinal y neocórtex superficial.
- Estadio II: amígdala e hipocampo.
- Estadio III: neocórtex profundo y núcleos subcorticales (núcleo caudado, putamen, tálamo, hipotálamo y mesencéfalo).

Es muy destacable el hecho de que ubiquen en la última de las etapas, además del marcado significativo del neocórtex, el de regiones del cuerpo estriado (núcleo caudado y putamen), que están implicadas en el control del movimiento; precisamente es en este estadio en el que describen que la aparición de los síntomas de parálisis más severos acaba rápidamente con la vida de los ratones. De manera equivalente, el ratón tau-P301S de Michael Goedert, también de fondo genético C57BL/6J pero bajo el promotor de *Thy1.2*, presenta la proteína tau hiperfosforilada en los núcleos cerebelosos profundos y el puente troncoencefálico coincidiendo en el tiempo con las etapas finales donde se manifiesta la degeneración progresiva a nivel motor [Koivisto *et al.*, 2019].

Si examinamos nuestros resultados en este marco, el deterioro de la región hipocampal junto al mantenimiento de la función motora y la integridad del PNS en el ratón Akp2/P301S sugieren una posible ralentización en el avance de la patología asociada a los agregados de tau hiperfosforilado en este modelo, respaldando este escenario nuestra hipótesis de partida por la que la reducción a la mitad de la dosis génica para la TNAP atenúa tanto el ciclo de retroalimentación positiva de activación de esta exoenzima como la propagación de tipo priónico a través de las estructuras que acabamos de describir. En este sentido, sería muy interesante ampliar los análisis aquí reflejados a las regiones en el eje de control del movimiento (corteza motora, cuerpo estriado y otros ganglios basales, cerebelo y médula espinal), para comprobar en qué puntos y en qué momentos se está produciendo esa ralentización del avance neurodegenerativo en este modelo.

La caracterización molecular detallada de la relación que existe entre los receptores muscarínicos [Ferreira-Vieira *et al.*, 2016], la proteína tau y la TNAP podría ser crucial para profundizar en nuestra comprensión de la fisiopatología de la AD, y ayudaría a explorar la utilidad potencial de la inhibición farmacológica de esta enzima extracelular. Tomados en conjunto, los resultados presentados en esta memoria sugieren que esta inhibición de la TNAP podría ser un objetivo terapéutico prometedor para la enfermedad de Alzheimer y otras taupatías.

## 6 Conclusiones

1. La proteína tau-P301S se encuentra sobreexpresada e hiperfosforilada en el hipocampo dorsal del ratón P301S a edades de aparición del fenotipo de parálisis (a partir de los 9 meses). Esta misma región presenta muerte celular, con atrofia del giro dentado, a esa edad; la atrofia no se observó a edades tempranas (2,5 meses). Simultáneamente a dicha apoptosis, se detectan astrogliosis y microgliosis reactivas también en dicha región; se halló microglía con morfología en bastón (*rod microglia*), asociada a lesiones agudas del sistema nervioso.
2. La proteína tau-P301S se encuentra sobreexpresada e hiperfosforilada en el nervio ciático del ratón P301S a edades de aparición del fenotipo de parálisis. Esta estructura presenta alteraciones a esa edad, que incluyen un aumento en el número de axones mielinizados en degeneración, y un cambio en la distribución de fibras según el calibre, con una disminución de aquellas de mayor diámetro.
3. Tres pruebas motoras sucesivas de rotarod entre los 8 y los 9 meses de edad permitieron registrar la caída del rendimiento de los ratones P301S, con diferencias significativas con respecto a los controles a los 9 meses (coincidiendo a esta edad con los daños detectados en el nervio ciático). No se encontraron diferencias significativas en pruebas de memoria y navegación espacial dependientes de hipocampo del modelo P301S.
4. El ratón P301S presenta una expresión tardía del transgén dentro de la neurogénesis adulta en el giro dentado del hipocampo dorsal. La proteína tau-P301S, bajo el promotor de *Prnp* murino, se detecta por primera vez en las etapas finales, con neuronas ya maduras positivas para el marcador calbindina.
5. El ratón P301S presenta un aumento de la neurogénesis adulta hipocampal a edades de aparición del fenotipo de parálisis, según los marcadores de etapas intermedias/finales doblecortina y calretinina; dado que la muerte celular se encuentra incrementada, con atrofia del giro dentado, este aumento de la neurogénesis se debe probablemente a un aumento en la proliferación de los precursores neuronales.
6. No se encontraron diferencias significativas a edades tempranas/intermedias en la morfología dendrítica de las nuevas neuronas generadas en la neurogénesis adulta hipocampal del ratón P301S, tras una integración completa en el circuito sináptico 8 semanas después del comienzo de su diferenciación.
7. El modelo doble Akp2/P301S presenta neurodegeneración en la región hipocampal a edades de aparición del fenotipo de parálisis, sin diferencias significativas con respecto al ratón P301S.

8. El ratón Akp2/P301S presenta un aumento de la neurogénesis adulta hipocampal a edades de aparición del fenotipo de parálisis, según el marcadores doblecortina, sin diferencias significativas con el ratón P301S.
9. El ratón Akp2/P301S revierte tanto las alteraciones del nervio ciático como los déficits motores en la prueba del rotarod del ratón P301S a edades de aparición del fenotipo de parálisis.
10. Los resultados obtenidos en el ratón Akp2/P301S sugieren una posible ralentización o interferencia con el avance de los daños neurodegenerativos, invitando a explorar la posible utilidad terapéutica de la inhibición farmacológica de esta exoenzima en la lucha contra la enfermedad de Alzheimer y otras taupatías.



## Referencias

- Adalbert, R., S. Milde, C. Durrant, K. Ando, V. Stygelbout, Z. Yilmaz, S. Gould, J. P. Brion y M. P. Coleman (2018). «Interaction between a MAPT variant causing frontotemporal dementia and mutant APP affects axonal transport». En: *Neurobiol. Aging* 68:68-75. DOI: [10.1016/j.neurobiolaging.2018.03.033](https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2018.03.033).
- Aimone, J. B., W. Deng y F. H. Gage (2011). «Resolving new memories: a critical look at the dentate gyrus, adult neurogenesis, and pattern separation». En: *Neuron* 70(4):589-596. DOI: [10.1016/j.neuron.2011.05.010](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.05.010).
- Allen, B., E. Ingram, M. Takao, M. J. Smith, R. Jakes, K. Virdee, H. Yoshida, M. Holzer, M. Craxton, P. C. Emson, C. Atzori, A. Migheli, R. A. Crowther, B. Ghetti, M. G. Spillantini y M. Goedert (2002). «Abundant tau filaments and nonapoptotic neurodegeneration in transgenic mice expressing human P301S tau protein». En: *J. Neurosci.* 22(21):9340-9351. DOI: [10.1523/JNEUROSCI.22-21-09340.2002](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-21-09340.2002).
- Alzforum (2019). *Alzheimer's disease research models*. <https://www.alzforum.org/research-models/alzheimers-disease>.
- Alzheimer, A. (1907). «Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde». En: *Allg. Z. Psychiat. Psych. Gerichtl. Med.* 64:146-148.
- Alzheimer, A., R. A. Stelzmann, H. N. Schnitzlein y F. R. Murtagh (1995). «An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde"». En: *Clin. Anat.* 8(6):429-431. DOI: [10.1002/ca.980080612](https://doi.org/10.1002/ca.980080612).
- Andreadis, A. (2005). «Tau gene alternative splicing: expression patterns, regulation and modulation of function in normal brain and neurodegenerative diseases». En: *Biochim. Biophys. Acta* 1739(2-3):91-103. DOI: [10.1016/j.bbadis.2004.08.010](https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2004.08.010).
- Andreadis, A., W. M. Brown y K. S. Kosik (1992). «Structure and novel exons of the human tau gene». En: *Biochemistry* 31(43):10626-10633. DOI: [10.1021/bi00158a027](https://doi.org/10.1021/bi00158a027).
- Arendt, T., J. T. Stieler y M. Holzer (2016). «Tau and tauopathies». En: *Brain Res. Bull.* 126(p.3): 238-292. DOI: [10.1016/j.brainresbull.2016.08.018](https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.08.018).
- Arrasate, M., S. Mitra, E. S. Schweitzer, M. R. Segal y S. Finkbeiner (2004). «Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death». En: *Nature* 431(7010):805-810. DOI: [10.1038/nature02998](https://doi.org/10.1038/nature02998).
- Arrasate, M., M. Pérez y J. Avila (2000). «Tau dephosphorylation at tau-1 site correlates with its association to cell membrane». En: *Neurochem. Res.* 25(1):43-50. DOI: [10.1023/A:1007583214722](https://doi.org/10.1023/A:1007583214722).
- Arriagada, P. V., J. H. Growdon, E. T. Hedley-Whyte y B. T. Hyman (1992). «Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease». En: *Neurology* 42(3-1):631-639. DOI: [10.1212/WNL.42.3.631](https://doi.org/10.1212/WNL.42.3.631).
- Audouard, E., L. Van Hees, V. Suain, Z. Yilmaz, L. Poncet, K. Leroy y J. P. Brion (2015). «Motor deficit in a tauopathy model is induced by disturbances of axonal transport leading to dying-back degeneration and denervation of neuromuscular junctions». En: *Am. J. Pathol.* 185(10):2685-2697. DOI: [10.1016/j.ajpath.2015.06.011](https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.06.011).
- Avila, J. (2008). «Tau kinases and phosphatases». En: *J. Cell. Mol. Med.* 12(1):258-259. DOI: [10.1111/j.1582-4934.2007.00214.x](https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2007.00214.x).
- Avila, J., E. G. de Barreda, N. Pallas-Bazarra y F. Hernandez (2013). «Tau and neuron aging». En: *Aging Dis.* 4(1):23-28.
- Avila, J. y F. Hernández (2007). «GSK-3 inhibitors for Alzheimer's disease». En: *Expert Rev. Neurother.* 7(11):1527-1533. DOI: [10.1586/14737175.7.11.1527](https://doi.org/10.1586/14737175.7.11.1527).
- Avila, J., J. S. Jiménez, C. L. Sayas, M. Bolós, J. C. Zabala, G. Rivas y F. Hernández (2016). «Tau Structures». En: *Front. Aging Neurosci.* 8:262. DOI: [10.3389/fnagi.2016.00262](https://doi.org/10.3389/fnagi.2016.00262).

- Avila, J., J. J. Lucas, M. Pérez y F. Hernández (2004). «Role of tau protein in both physiological and pathological conditions». En: *Physiol. Rev.* 84(2):361-384. DOI: [10.1152/physrev.00024.2003](https://doi.org/10.1152/physrev.00024.2003).
- Baas, P. W. y L. Qiang (2019). «Tau: It's Not What You Think». En: *Trends Cell Biol.* DOI: [10.1016/j.tcb.2019.02.007](https://doi.org/10.1016/j.tcb.2019.02.007).
- Babu, J. R., T. Geetha y M. W. Wooten (2005). «Sequestosome 1/p62 shuttles polyubiquitinated tau for proteasomal degradation». En: *J. Neurochem.* 94(1):192-203. DOI: [10.1111/j.1471-4159.2005.03181.x](https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03181.x).
- Baker, M., I. R. Mackenzie, S. M. Pickering-Brown, J. Gass, R. Rademakers, C. Lindholm, J. Snowden, J. Adamson, A. D. Sadovnick, S. Rollinson, A. Cannon, E. Dwosh, D. Neary, S. Melquist, A. Richardson, D. Dickson, Z. Berger, J. Eriksen, T. Robinson, C. Zehr, C. A. Dickey, R. Crook, E. McGowan, D. Mann, B. Boeve, H. Feldman y M. Hutton (2006). «Mutations in progranulin cause tau-negative frontotemporal dementia linked to chromosome 17». En: *Nature* 442(7105):916-919. DOI: [10.1038/nature05016](https://doi.org/10.1038/nature05016).
- Bala, U., K. L. Tan, K. H. Ling y P. S. Cheah (2014). «Harvesting the maximum length of sciatic nerve from adult mice: a step-by-step approach». En: *BMC Res. Notes* 7:714. DOI: [10.1186/1756-0500-7-714](https://doi.org/10.1186/1756-0500-7-714).
- Bemiller, S. M., T. J. McCray, K. Allan, S. V. Formica, G. Xu, G. Wilson, O. N. Kokiko-Cochran, S. D. Crish, C. A. Lasagna-Reeves, R. M. Ransohoff, G. E. Landreth y B. T. Lamb (2017). «TREM2 deficiency exacerbates tau pathology through dysregulated kinase signaling in a mouse model of tauopathy». En: *Mol. Neurodegener.* 12(1). DOI: [10.1186/s13024-017-0216-6](https://doi.org/10.1186/s13024-017-0216-6).
- Bendheim, P. E., H. R. Brown, R. D. Rudelli, L. J. Scala, N. L. Goller, G. Y. Wen, R. J. Kascsak, N. R. Cashman y D. C. Bolton (1992). «Nearly ubiquitous tissue distribution of the scrapie agent precursor protein». En: *Neurology* 42(1):149-156. DOI: [10.1212/wnl.42.1.149](https://doi.org/10.1212/wnl.42.1.149).
- Bio-Rad (2019). *Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell. Instruction Manual*. <https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/M1703930.pdf>.
- Blocq, P. y G. Marinesco (1882). «Sur les lésions et la pathogénie de l'épilepsie dite essentielle». En: *Sem. Méd.* 12:445-446.
- Boekhoorn, K., D. Terwel, B. Biemans, P. Borghgraef, O. Wiegert, G. J. Ramakers, K. de Vos, H. Krugers, T. Tomiyama, H. Mori, M. Joels, F. van Leuven y P. J. Lucassen (2006). «Improved long-term potentiation and memory in young tau-P301L transgenic mice before onset of hyperphosphorylation and tauopathy». En: *J. Neurosci.* 26(13):3514-3523. DOI: [10.1523/JNEUROSCI.5425-05.2006](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5425-05.2006).
- Boeve, B. F. y M. Hutton (2008). «Refining frontotemporal dementia with parkinsonism linked to chromosome 17: introducing FTDP-17 (MAPT) and FTDP-17 (PGRN)». En: *Arch. Neurol.* 65(4):460-464. DOI: [10.1001/archneur.65.4.460](https://doi.org/10.1001/archneur.65.4.460).
- Bolós, M., M. Llorens-Martín, J. R. Perea, J. Jurado-Arjona, A. Rábano, F. Hernández y J. Avila (2017). «Absence of CX3CR1 impairs the internalization of Tau by microglia». En: *Mol. Neurodegener.* 12(1):59. DOI: [10.1186/s13024-017-0200-1](https://doi.org/10.1186/s13024-017-0200-1).
- Bondareff, W., C. Q. Mountjoy y M. Roth (1982). «Loss of neurons of origin of the adrenergic projection to cerebral cortex (nucleus locus ceruleus) in senile dementia». En: *Neurology* 32(2):164-168. DOI: [10.1212/wnl.32.2.164](https://doi.org/10.1212/wnl.32.2.164).
- Braak, H. y E. Braak (1991). «Neuropathological staging of Alzheimer-related changes». En: *Acta Neuropathol.* 82(4):239-259. DOI: [10.1007/BF00308809](https://doi.org/10.1007/BF00308809).
- Braak, H. y K. Del Tredici (2011). «The pathological process underlying Alzheimer's disease in individuals under thirty». En: *Acta Neuropathol.* 121(2):171-181. DOI: [10.1007/s00401-010-0789-4](https://doi.org/10.1007/s00401-010-0789-4).

- Bradford, B. M., N. L. Tuzi, M. L. Feltri, C. McCorquodale, E. Cancellotti y J. C. Manson (2009). «Dramatic reduction of PrP<sup>C</sup> level and glycosylation in peripheral nerves following PrP knock-out from Schwann cells does not prevent transmissible spongiform encephalopathy neuroinvasion». En: *J. Neurosci.* 29(49):15445-15454. DOI: [10.1523/JNEUROSCI.4195-09.2009](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4195-09.2009).
- Bradford, M. M. (1976). «A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding». En: *Anal. Biochem.* 72:248-254. DOI: [10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- Brion, J. P., J. N. Octave y A. M. Couck (1994). «Distribution of the phosphorylated microtubule-associated protein tau in developing cortical neurons». En: *Neuroscience* 63(3):895-909. DOI: [10.1016/0306-4522\(94\)90533-9](https://doi.org/10.1016/0306-4522(94)90533-9).
- Brion, J. P., G. Tremp y J. N. Octave (1999). «Transgenic expression of the shortest human tau affects its compartmentalization and its phosphorylation as in the pretangle stage of Alzheimer's disease». En: *Am. J. Pathol.* 154(1):255-270. DOI: [10.1016/S0002-9440\(10\)65272-8](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65272-8).
- Brownlee, J., N. G. Irving, J. P. Brion, B. J. Gibb, U. Wagner, J. Woodgett y C. C. Miller (1997). «Tau phosphorylation in transgenic mice expressing glycogen synthase kinase-3 $\beta$  transgenes». En: *Neuroreport* 8(15):3251-3255. DOI: [10.1097/00001756-199710200-00013](https://doi.org/10.1097/00001756-199710200-00013).
- Bugiani, O., J. R. Murrell, G. Giaccone, M. Hasegawa, G. Ghigo, M. Tabaton, M. Morbin, A. Primavera, F. Carella, C. Solaro, M. Grisoli, M. Savoiano, M. G. Spillantini, F. Tagliavini, M. Goedert y B. Ghetti (1999). «Frontotemporal dementia and corticobasal degeneration in a family with a P301S mutation in tau». En: *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 58(6):667-677. DOI: [10.1097/00005072-199906000-00011](https://doi.org/10.1097/00005072-199906000-00011).
- Bullmann, T., R. de Silva, M. Holzer, H. Mori y T. Arendt (2007). «Expression of embryonic tau protein isoforms persist during adult neurogenesis in the hippocampus». En: *Hippocampus* 17(2):98-102. DOI: [10.1002/hipo.20255](https://doi.org/10.1002/hipo.20255).
- Calignon, A. de, M. Polydoro, M. Suárez-Calvet, C. William, D. H. Adamowicz, K. J. Kopeikina, R. Pitstick, N. Sahara, K. H. Ashe, G. A. Carlson, T. L. Spires-Jones y B. T. Hyman (2012). «Propagation of tau pathology in a model of early Alzheimer's disease». En: *Neuron* 73(4):685-697. DOI: [10.1016/j.neuron.2011.11.033](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.11.033).
- Camero, S., M. J. Benítez, R. Cuadros, F. Hernández, J. Ávila y J. S. Jiménez (2014). «Thermodynamics of the interaction between Alzheimer's disease related tau protein and DNA». En: *PLoS One* 9(8):e104690. DOI: [10.1371/journal.pone.0104690](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104690).
- Chai, X., J. L. Dage y M. Citron (2012). «Constitutive secretion of tau protein by an unconventional mechanism». En: *Neurobiol. Dis.* 48(3):356-366. DOI: [10.1016/j.nbd.2012.05.021](https://doi.org/10.1016/j.nbd.2012.05.021).
- Chesser, A. S., S. M. Pritchard y G. V. Johnson (2013). «Tau clearance mechanisms and their possible role in the pathogenesis of Alzheimer disease». En: *Front. Neurol.* 4. DOI: [10.3389/fneur.2013.00122](https://doi.org/10.3389/fneur.2013.00122).
- Clavaguera, F., T. Bolmont, R. A. Crowther, D. Abramowski, S. Frank, A. Probst, G. Fraser, A. K. Stalder, M. Beibel, M. Staufenbiel, M. Jucker, M. Goedert y M. Tolnay (2009). «Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain». En: *Nat. Cell Biol.* 11(7):909-913. DOI: [10.1038/ncb1901](https://doi.org/10.1038/ncb1901).
- Cowan, C. M. y A. Mudher (2013). «Are tau aggregates toxic or protective in tauopathies?» En: *Front. Neurol.* 4:114. DOI: [10.3389/fneur.2013.00114](https://doi.org/10.3389/fneur.2013.00114).
- Curtis, M. A., E. B. Penney, A. G. Pearson, W. M. van Roon-Mom, N. J. Butterworth, M. Dragunow, B. Connor y R. L. Faull (2003). «Increased cell proliferation and neurogenesis in the adult human Huntington's disease brain». En: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100(15):9023-9027. DOI: [10.1073/pnas.1532244100](https://doi.org/10.1073/pnas.1532244100).
- Delobel, P., I. Lavenir, B. Ghetti, M. Holzer y M. Goedert (2006). «Cell-cycle markers in a transgenic mouse model of human tauopathy: increased levels of cyclin-dependent kinase inhibitors p21Cip1 and p27Kip1». En: *Am. J. Pathol.* 168(3):878-887. DOI: [10.2353/ajpath.2006.050540](https://doi.org/10.2353/ajpath.2006.050540).

- Deng, W., J. B. Aimone y F. H. Gage (2010). «New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory?» En: *Nat. Rev. Neurosci.* 11(5):339-350. DOI: [10.1038/nrn2822](https://doi.org/10.1038/nrn2822).
- Díaz-Hernández, M., A. Gómez-Ramos, A. Rubio, R. Gómez-Villafuertes, J. R. Naranjo, M. T. Miras-Portugal y J. Avila (2010). «Tissue-nonspecific alkaline phosphatase promotes the neurotoxicity effect of extracellular tau». En: *J. Biol. Chem.* 285(42):32539-32548. DOI: [10.1074/jbc.M110.145003](https://doi.org/10.1074/jbc.M110.145003).
- Díaz-Hernández, M., F. Hernández, M. T. Miras-Portugal y J. Avila (2015). «TNAP Plays a Key Role in Neural Differentiation as well as in Neurodegenerative Disorders». En: *Subcell. Biochem.* 76:375-385. DOI: [10.1007/978-94-017-7197-9\\_18](https://doi.org/10.1007/978-94-017-7197-9_18).
- Doetsch, F. y R. Hen (2005). «Young and excitable: the function of new neurons in the adult mammalian brain». En: *Curr. Opin. Neurobiol.* 15(1):121-128. DOI: [10.1016/j.conb.2005.01.018](https://doi.org/10.1016/j.conb.2005.01.018).
- Dotti, C. G., G. A. Banker y L. I. Binder (1987). «The expression and distribution of the microtubule-associated proteins tau and microtubule-associated protein 2 in hippocampal neurons in the rat in situ and in cell culture». En: *Neuroscience* 23(1):121-130. DOI: [10.1016/0306-4522\(87\)90276-4](https://doi.org/10.1016/0306-4522(87)90276-4).
- Dotti, C. G., C. A. Sullivan y G. A. Banker (1988). «The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture». En: *J. Neurosci.* 8(4):1454-1468. DOI: [10.1523/JNEUROSCI.08-04-01454.1988](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.08-04-01454.1988).
- Dregni, A. J., V. S. Mandala, H. Wu, M. R. Elkins, H. K. Wang, I. Hung, W. F. DeGrado y M. Hong (2019). «In vitro 0N4R tau fibrils contain a monomorphic  $\beta$ -sheet core enclosed by dynamically heterogeneous fuzzy coat segments». En: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 116(33):16357-16366. DOI: [10.1073/pnas.1906839116](https://doi.org/10.1073/pnas.1906839116).
- Dujardin, S., K. Lécolle, R. Caillierez, S. Bégar, N. Zommer, C. Lachaud, S. Carrier, N. Dufour, G. Aurégan, J. Winderickx, P. Hantraye, N. Déglon, M. Colin y L. Buée (2014). «Neuron-to-neuron wild-type Tau protein transfer through a trans-synaptic mechanism: relevance to sporadic tauopathies». En: *Acta Neuropathol. Commun.* 2:14. DOI: [10.1186/2051-5960-2-14](https://doi.org/10.1186/2051-5960-2-14).
- Duyckaerts, C., F. Clavaguera y M. C. Potier (2019). «The prion-like propagation hypothesis in Alzheimer's and Parkinson's disease». En: *Curr. Opin. Neurol.* 32(2):266-271. DOI: [10.1097/WCO.0000000000000672](https://doi.org/10.1097/WCO.0000000000000672).
- Eckermann, K., M. M. Mocanu, I. Khlistunova, J. Biernat, A. Nissen, A. Hofmann, K. Schöni, H. Bujard, A. Haemisch, E. Mandelkow, L. Zhou, G. Rune y E. M. Mandelkow (2007). «The  $\beta$ -propensity of Tau determines aggregation and synaptic loss in inducible mouse models of tauopathy». En: *J. Biol. Chem.* 282(43):31755-31765. DOI: [10.1074/jbc.M705282200](https://doi.org/10.1074/jbc.M705282200).
- Engel, T., P. Goñi-Oliver, J. J. Lucas, J. Avila y F. Hernández (2006). «Chronic lithium administration to FTDP-17 tau and GSK-3 $\beta$  overexpressing mice prevents tau hyperphosphorylation and neurofibrillary tangle formation, but pre-formed neurofibrillary tangles do not revert». En: *J. Neurochem.* 99(6):1445-1455. DOI: [10.1111/j.1471-4159.2006.04139.x](https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04139.x).
- Engel, T., F. Hernández, J. Avila y J. J. Lucas (2006). «Full reversal of Alzheimer's disease-like phenotype in a mouse model with conditional overexpression of glycogen synthase kinase-3». En: *J. Neurosci.* 26(19):5083-5090. DOI: [10.1523/JNEUROSCI.0604-06.2006](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0604-06.2006).
- Engel, T., J. J. Lucas, P. Gómez-Ramos, M. A. Moran, J. Ávila y F. Hernández (2006). «Cooexpression of FTDP-17 tau and GSK-3 $\beta$  in transgenic mice induce tau polymerization and neurodegeneration». En: *Neurobiol. Aging* 27(9):1258-1268. DOI: [10.1016/j.neurobiolaging.2005.06.010](https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2005.06.010).
- Eriksson, P. S., E. Perfilieva, T. Björk-Eriksson, A. M. Alborn, C. Nordborg, D. A. Peterson y F. H. Gage (1998). «Neurogenesis in the adult human hippocampus». En: *Nat. Med.* 4(11):1313-1317. DOI: [10.1038/3305](https://doi.org/10.1038/3305).
- Espósito, M. S., V. C. Piatti, D. A. Laplagne, N. A. Morgenstern, C. C. Ferrari, F. J. Pitossi y A. F. Schinder (2005). «Neuronal differentiation in the adult hippocampus recapitulates embryonic development». En: *J. Neurosci.* 25(44):10074-10086. DOI: [10.1523/JNEUROSCI.3114-05.2005](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3114-05.2005).

- Falcon, B., A. Cavallini, R. Angers, S. Glover, T. K. Murray, L. Barnham, S. Jackson, M. J. O'Neill, A. M. Isaacs, M. L. Hutton, P. G. Szekeres, M. Goedert y S. Bose (2015). «Conformation determines the seeding potencies of native and recombinant Tau aggregates». En: *J. Biol. Chem.* 290(2):1049-1065. DOI: [10.1074/jbc.M114.589309](https://doi.org/10.1074/jbc.M114.589309).
- Ferreira-Vieira, T. H., I. M. Guimaraes, F. R. Silva y F. M. Ribeiro (2016). «Alzheimer's disease: Targeting the Cholinergic System». En: *Curr. Neuropharmacol.* 14(1):101-115. DOI: [10.2174/1570159X13666150716165726](https://doi.org/10.2174/1570159X13666150716165726).
- Ferreira, T. A., A. V. Blackman, J. Oyrer, S. Jayabal, A. J. Chung, A. J. Watt, P. J. Sjöström y D. J. van Meyel (2014). «Neuronal morphometry directly from bitmap images». En: *Nat. Methods* 11(10):982-984. DOI: [10.1038/nmeth.3125](https://doi.org/10.1038/nmeth.3125).
- Filippov, V., G. Kronenberg, T. Pivneva, K. Reuter, B. Steiner, L. P. Wang, M. Yamaguchi, H. Kettenmann y G. Kempermann (2003). «Subpopulation of nestin-expressing progenitor cells in the adult murine hippocampus shows electrophysiological and morphological characteristics of astrocytes». En: *Mol. Cell. Neurosci.* 23(3):373-382. DOI: [10.1016/S1044-7431\(03\)00060-5](https://doi.org/10.1016/S1044-7431(03)00060-5).
- Fischer, O. (1907). «Miliare Nekrosen mit drüsigen Wucherungen der Neurofibrillen, eine regelmässige Veränderung der Hirnrinde bei seniler Demenz». En: *Monatsschr. Psychiat. Neurol.* 22:361-372.
- Ford, M. J., L. J. Burton, H. Li, C. H. Graham, Y. Frobert, J. Grassi, S. M. Hall y R. J. Morris (2002). «A marked disparity between the expression of prion protein and its message by neurones of the CNS». En: *Neuroscience* 111(3):533-551. DOI: [10.1016/s0306-4522\(01\)00603-0](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(01)00603-0).
- Francis, F., A. Koulakoff, D. Boucher, P. Chafey, B. Schaar, M. C. Vinet, G. Friocourt, N. McDonnell, O. Reiner, A. Kahn, S. K. McConnell, Y. Berwald-Netter, P. Denoulet y J. Chelly (1999). «Doublecortin is a developmentally regulated, microtubule-associated protein expressed in migrating and differentiating neurons». En: *Neuron* 23(2):247-256. DOI: [10.1016/S0896-6273\(00\)80777-1](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80777-1).
- Frاندemiche, M. L., S. De Seranno, T. Rush, E. Borel, A. Elie, I. Arnal, F. Lanté y A. Buisson (2014). «Activity-dependent tau protein translocation to excitatory synapse is disrupted by exposure to amyloid-beta oligomers». En: *J. Neurosci.* 34(17):6084-6097. DOI: [10.1523/JNEUROSCI.4261-13.2014](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4261-13.2014).
- Frost, B., R. L. Jacks y M. I. Diamond (2009). «Propagation of tau misfolding from the outside to the inside of a cell». En: *J. Biol. Chem.* 284(19):12845-12852. DOI: [10.1074/jbc.M808759200](https://doi.org/10.1074/jbc.M808759200).
- Fuster-Matanzo, A., E. G. de Barreda, H. N. Dawson, M. P. Vitek, J. Avila y F. Hernández (2009). «Function of tau protein in adult newborn neurons». En: *FEBS Lett.* 583(18):3063-3068. DOI: [10.1016/j.febslet.2009.08.017](https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.08.017).
- Fuster-Matanzo, A., F. Hernández y J. Ávila (2018). «Tau Spreading Mechanisms; Implications for Dysfunctional Tauopathies». En: *Int. J. Mol. Sci.* 19(3). DOI: [10.3390/ijms19030645](https://doi.org/10.3390/ijms19030645).
- Fuster-Matanzo, A., M. Llorens-Martín, J. Jurado-Arjona, J. Avila y F. Hernández (2012). «Tau protein and adult hippocampal neurogenesis». En: *Front. Neurosci.* 6:104. DOI: [10.3389/fnins.2012.00104](https://doi.org/10.3389/fnins.2012.00104).
- Fuster-Matanzo, A., M. Llorens-Martín, M. S. Sirerol-Piquer, J. M. García-Verdugo, J. Avila y F. Hernández (2013). «Dual effects of increased glycogen synthase kinase-3 $\beta$  activity on adult neurogenesis». En: *Hum. Mol. Genet.* 22(7):1300-1315. DOI: [10.1093/hmg/dds533](https://doi.org/10.1093/hmg/dds533).
- Ghabriel, M. N. y G. Allt (1979a). «The role of Schmidt-Lanterman incisures in Wallerian degeneration. I. A quantitative teased fibre study». En: *Acta Neuropathol.* 48(2):93. DOI: [10.1007/BF00691149](https://doi.org/10.1007/BF00691149).
- Ghabriel, M. N. y G. Allt (1979b). «The role of Schmidt-Lanterman incisures in Wallerian degeneration. II. An electron microscopic study». En: *Acta Neuropathol.* 48(2):95-103. DOI: [10.1007/bf00691150](https://doi.org/10.1007/bf00691150).



- Gleeson, J. G., P. T. Lin, L. A. Flanagan y C. A. Walsh (1999). «Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons». En: *Neuron* 23(2):257-271. DOI: [10.1016/S0896-6273\(00\)80778-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80778-3).
- Goedert, M., R. Jakes y E. Vanmechelen (1995). «Monoclonal antibody AT8 recognises tau protein phosphorylated at both serine 202 and threonine 205». En: *Neurosci. Lett.* 189(3):167-169. DOI: [10.1016/0304-3940\(95\)11484-e](https://doi.org/10.1016/0304-3940(95)11484-e).
- Goedert, M., M. G. Spillantini y R. A. Crowther (1992). «Cloning of a big tau microtubule-associated protein characteristic of the peripheral nervous system». En: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89(5):1983-1987. DOI: [10.1073/pnas.89.5.1983](https://doi.org/10.1073/pnas.89.5.1983).
- Gómez-Ramos, A., M. Díaz-Hernández, R. Cuadros, F. Hernández y J. Avila (2006). «Extracellular tau is toxic to neuronal cells». En: *FEBS Lett.* 580(20):4842-4850. DOI: [10.1016/j.febslet.2006.07.078](https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.07.078).
- Gómez-Ramos, A., M. Díaz-Hernández, A. Rubio, M. T. Miras-Portugal y J. Avila (2008). «Extracellular tau promotes intracellular calcium increase through M1 and M3 muscarinic receptors in neuronal cells». En: *Mol. Cell. Neurosci.* 37(4):673-681. DOI: [10.1016/j.mcn.2007.12.010](https://doi.org/10.1016/j.mcn.2007.12.010).
- Gomez-Sintes, R., F. Hernández, J. J. Lucas y J. Avila (2011). «GSK-3 Mouse Models to Study Neuronal Apoptosis and Neurodegeneration». En: *Front. Mol. Neurosci.* 4(45). DOI: [10.3389/fnmol.2011.00045](https://doi.org/10.3389/fnmol.2011.00045).
- Gong, C. X., T. J. Singh, I. Grundke-Iqbal y K. Iqbal (1993). «Phosphoprotein phosphatase activities in Alzheimer disease brain». En: *J. Neurochem.* 61(3):921-927. DOI: [10.1111/j.1471-4159.1993.tb03603.x](https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1993.tb03603.x).
- Goodman, T., S. Trouche, I. Massou, L. Verret, M. Zerwas, P. Roulet y C. Rampon (2010). «Young hippocampal neurons are critical for recent and remote spatial memory in adult mice». En: *Neuroscience* 171(3):769-778. DOI: [10.1016/j.neuroscience.2010.09.047](https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.09.047).
- Goodwin, L. O., E. Splinter, T. L. Davis, R. Urban, H. He, R. E. Braun, E. J. Chesler, V. Kumar, M. van Min, J. Ndukum, V. M. Philip, L. G. Reinholdt, K. Svenson, J. K. White, M. Sasner, C. Lutz y S. A. Murray (2019). «Large-scale discovery of mouse transgenic integration sites reveals frequent structural variation and insertional mutagenesis». En: *Genome Res.* 29(3):494-505. DOI: [10.1101/gr.233866.117](https://doi.org/10.1101/gr.233866.117).
- Götz, J., A. Probst, M. G. Spillantini, T. Schafer, R. Jakes, K. Bürki y M. Goedert (1995). «Somatodendritic localization and hyperphosphorylation of tau protein in transgenic mice expressing the longest human brain tau isoform». En: *EMBO J.* 14(7):1304-1313. DOI: [10.1002/j.1460-2075.1995.tb07116.x](https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb07116.x).
- Götz, J., M. Tolnay, R. Barmettler, A. Ferrari, K. Bürki, M. Goedert, A. Probst y R. M. Nitsch (2001). «Human tau transgenic mice. Towards an animal model for neuro- and glialfibrillary lesion formation». En: *Adv. Exp. Med. Biol.* 487:71-83. DOI: [10.1007/978-1-4615-1249-3\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1249-3_6).
- Gremer, L., D. Schölzel, C. Schenk, E. Reinartz, J. Labahn, R. B. G. Ravelli, M. Tusche, C. Lopez-Iglesias, W. Hoyer, H. Heise, D. Willbold y G. F. Schröder (2017). «Fibril structure of amyloid- $\beta$ (1-42) by cryo-electron microscopy». En: *Science* 358(6359):116-119. DOI: [10.1126/science.aao2825](https://doi.org/10.1126/science.aao2825).
- Grudzien, A., P. Shaw, S. Weintraub, E. Bigio, D. C. Mash y M. M. Mesulam (2007). «Locus coeruleus neurofibrillary degeneration in aging, mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease». En: *Neurobiol. Aging* 28(3):327-335. DOI: [10.1016/j.neurobiolaging.2006.02.007](https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2006.02.007).
- Grundke-Iqbal, I., K. Iqbal, Y. C. Tung, M. Quinlan, H. M. Wisniewski y L. I. Binder (1986). «Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology». En: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83(13):4913-4917. DOI: [10.1073/pnas.83.13.4913](https://doi.org/10.1073/pnas.83.13.4913).
- Gulyás, A. I., R. Miettinen, D. M. Jacobowitz y T. F. Freund (1992). «Calretinin is present in non-pyramidal cells of the rat hippocampus—I. A new type of neuron specifically associated with the mossy fibre system». En: *Neuroscience* 48(1):1-27. DOI: [10.1016/0306-4522\(92\)90334-x](https://doi.org/10.1016/0306-4522(92)90334-x).

- Gulyás, B., D. Brockschneider, S. Nag, E. Pavlova, P. Kása, Z. Beliczai, A. Légrádi, K. Gulya, A. Thiele, T. Dyrks y C. Halldin (2010). «The norepinephrine transporter (NET) radioligand (S,S)-[<sup>18</sup>F]FMeNER-D<sub>2</sub> shows significant decreases in NET density in the human brain in Alzheimer's disease: a post-mortem autoradiographic study». En: *Neurochem. Int.* 56(6-7):789-798. DOI: [10.1016/j.neuint.2010.03.001](https://doi.org/10.1016/j.neuint.2010.03.001).
- Gumucio, A., L. Lannfelt y L. N. Nilsson (2013). «Lack of exon 10 in the murine tau gene results in mild sensorimotor defects with aging». En: *BMC Neurosci.* 14(148). DOI: [10.1186/1471-2202-14-148](https://doi.org/10.1186/1471-2202-14-148).
- Guo, J. L. y V. M. Lee (2014). «Cell-to-cell transmission of pathogenic proteins in neurodegenerative diseases». En: *Nat. Med.* 20(2):130-138. DOI: [10.1038/nm.3457](https://doi.org/10.1038/nm.3457).
- Haglund, M., M. Sjöbeck y E. Englund (2006). «Locus ceruleus degeneration is ubiquitous in Alzheimer's disease: possible implications for diagnosis and treatment». En: *Neuropathology* 26(6):528-532. DOI: [10.1111/j.1440-1789.2006.00725.x](https://doi.org/10.1111/j.1440-1789.2006.00725.x).
- Hampel, H., K. Buerger, R. Kohnen, S. J. Teipel, R. Zinkowski, H. J. Moeller, S. I. Rapoport y P. Davies (2001). «Tracking of Alzheimer's disease progression with cerebrospinal fluid tau protein phosphorylated at threonine 231». En: *Ann. Neurol.* 49(4):545-566. DOI: [10.1002/ana.111.abs](https://doi.org/10.1002/ana.111.abs).
- Hampel, H., K. Burger, J. C. Pruessner, R. Zinkowski, J. DeBernardis, D. Kerkman, G. Leinsinger, A. C. Evans, P. Davies, H. J. Moller y S. J. Teipel (2005). «Correlation of cerebrospinal fluid levels of tau protein phosphorylated at threonine 231 with rates of hippocampal atrophy in Alzheimer disease». En: *Arch Neurol.* 62(5):770-773. DOI: [10.1001/archneur.62.5.770](https://doi.org/10.1001/archneur.62.5.770).
- Hampel, H., S. J. Teipel, T. Fuchsberger, N. Andreasen, J. Wiltfang, M. Otto, Y. Shen, R. Dodel, Y. Du, M. Farlow, H. J. Moller, K. Blennow y K. Buerger (2004). «Value of CSF  $\beta$ -amyloid<sub>1-42</sub> and tau as predictors of Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment». En: *Mol. Psychiatry* 9(7):705-710. DOI: [10.1038/sj.mp.4001473](https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001473).
- Hanics, J., J. Barna, J. Xiao, J. L. Millán, C. Fonta y L. Négyessy (2012). «Ablation of TNAP function compromises myelination and synaptogenesis in the mouse brain». En: *Cell Tissue Res.* 349(2):459-471. DOI: [10.1007/s00441-012-1455-z](https://doi.org/10.1007/s00441-012-1455-z).
- Hardy, J. A. y G. A. Higgins (1992). «Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis». En: *Science* 256(5054):184-185. DOI: [10.1126/science.1566067](https://doi.org/10.1126/science.1566067).
- Hardy, J. y D. Allsop (1991). «Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease». En: *Trends Pharmacol. Sci.* 12(10):383-388. DOI: [10.1016/0165-6147\(91\)90609-v](https://doi.org/10.1016/0165-6147(91)90609-v).
- Hasegawa, M., M. J. Smith y M. Goedert (1998). «Tau proteins with FTDP-17 mutations have a reduced ability to promote microtubule assembly». En: *FEBS Lett.* 437(3):207-210. DOI: [10.1016/s0014-5793\(98\)01217-4](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(98)01217-4).
- Hernández, F., J. Borrell, C. Guaza, J. Avila y J. J. Lucas (2002). «Spatial learning deficit in transgenic mice that conditionally over-express GSK-3 $\beta$  in the brain but do not form tau filaments». En: *J. Neurochem.* 83(6):1529-1533. DOI: [10.1046/j.1471-4159.2002.01269.x](https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.01269.x).
- Hernandez, F., J. J. Lucas y J. Avila (2013). «GSK3 and tau: two convergence points in Alzheimer's disease». En: *J. Alzheimers Dis.* 33(s.1):S141-S144. DOI: [10.3233/JAD-2012-129025](https://doi.org/10.3233/JAD-2012-129025).
- Hernández, F., J. J. Lucas, R. Cuadros y J. Avila (2003). «GSK-3 dependent phosphoepitopes recognized by PHF-1 and AT-8 antibodies are present in different tau isoforms». En: *Neurobiol. Aging* 24(8):1087-1094. DOI: [10.1016/j.neurobiolaging.2003.04.002](https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2003.04.002).
- Higuchi, M., T. Ishihara, B. Zhang, M. Hong, A. Andreadis, J. Trojanowski y V. M. Lee (2002). «Transgenic mouse model of tauopathies with glial pathology and nervous system degeneration». En: *Neuron* 35(3):433-446. DOI: [10.1016/S0896-6273\(02\)00789-4](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)00789-4).
- Hoffmann, N. A., M. M. Dorostkar, S. Blumenstock, M. Goedert y J. Herms (2013). «Impaired plasticity of cortical dendritic spines in P301S tau transgenic mice». En: *Acta Neuropathol. Commun.* 1:82. DOI: [10.1186/2051-5960-1-82](https://doi.org/10.1186/2051-5960-1-82).



- Hong, X. P., C. X. Peng, W. Wei, Q. Tian, Y. H. Liu, X. Q. Yao, Y. Zhang, F. Y. Cao, Q. Wang y J. Z. Wang (2010). «Essential role of tau phosphorylation in adult hippocampal neurogenesis». En: *Hippocampus* 20(12):1339-1349. DOI: [10.1002/hipo.20712](https://doi.org/10.1002/hipo.20712).
- Hoover, B. R., M. N. Reed, J. Su, R. D. Penrod, L. A. Kotilinek, M. K. Grant, R. Pitstick, G. A. Carlson, L. M. Lanier, L. L. Yuan, K. H. Ashe y D. Liao (2010). «Tau mislocalization to dendritic spines mediates synaptic dysfunction independently of neurodegeneration». En: *Neuron* 68(6):1067-1081. DOI: [10.1016/j.neuron.2010.11.030](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.11.030).
- Hoshi, T., A. Suzuki, S. Hayashi, K. Tohyama, A. Hayashi, Y. Yamaguchi, K. Takeuchi y H. Baba (2007). «Nodal protrusions, increased Schmidt-Lanterman incisures, and paranodal disorganization are characteristic features of sulfatide-deficient peripheral nerves». En: *Glia* 55(6):584-694. DOI: [10.1002/glia.20487](https://doi.org/10.1002/glia.20487).
- Huijbers, W., A. P. Schultz, K. V. Papp, M. R. LaPoint, B. Hanseeuw, J. P. Chhatwal, T. Hedden, K. A. Johnson y R. A. Sperling (2019). «Tau Accumulation in Clinically Normal Older Adults Is Associated with Hippocampal Hyperactivity». En: *J. Neurosci.* 39(3):548-556. DOI: [10.1523/JNEUROSCI.1397-18.2018](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1397-18.2018).
- Hurtado, D. E., L. Molina-Porcel, M. Iba, A. K. Aboagye, S. M. Paul, J. Q. Trojanowski y V. M. Lee (2010). «A $\beta$  accelerates the spatiotemporal progression of tau pathology and augments tau amyloidosis in an Alzheimer mouse model». En: *Am. J. Pathol.* 177(4):1977-1988. DOI: [10.2353/ajpath.2010.100346](https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.100346).
- Hüttmann, K., M. Sadgrove, A. Wallraff, S. Hinterkeuser, F. Kirchhoff, C. Steinhäuser y W. P. Gray (2003). «Seizures preferentially stimulate proliferation of radial glia-like astrocytes in the adult dentate gyrus: functional and immunocytochemical analysis». En: *Eur. J. Neurosci.* 18(10):2769-2778. DOI: [10.1111/j.1460-9568.2003.03002.x](https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2003.03002.x).
- Iba, M., J. L. Guo, J. D. McBride, B. Zhang, J. Q. Trojanowski y V. M. Lee (2013). «Synthetic tau fibrils mediate transmission of neurofibrillary tangles in a transgenic mouse model of Alzheimer's-like tauopathy». En: *J. Neurosci.* 33(3):1024-1037. DOI: [10.1523/JNEUROSCI.2642-12.2013](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2642-12.2013).
- Ishihara, T., M. Hong, B. Zhang, Y. Nakagawa, M. K. Lee, J. Q. Trojanowski y V. M. Lee (1999). «Age-dependent emergence and progression of a tauopathy in transgenic mice overexpressing the shortest human tau isoform». En: *Neuron* 24(3):751-762. DOI: [10.1016/S0896-6273\(00\)81127-7](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)81127-7).
- Ishihara, T., B. Zhang, M. Higuchi, Y. Yoshiyama, J. Q. Trojanowski y V. M. Lee (2001). «Age-dependent induction of congophilic neurofibrillary tau inclusions in tau transgenic mice». En: *Am. J. Pathol.* 158(2):555-562. DOI: [10.1016/S0002-9440\(10\)63997-1](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63997-1).
- Ittner, L. M., T. Fath, Y. D. Ke, M. Bi, J. van Eersel, K. M. Li, P. Gunning y J. Götz (2008). «Parkinsonism and impaired axonal transport in a mouse model of frontotemporal dementia». En: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105(41):15997-16002. DOI: [10.1073/pnas.0808084105](https://doi.org/10.1073/pnas.0808084105).
- Ittner, L. M., Y. D. Ke, F. Delerue, M. Bi, A. Gladbach, J. van Eersel, H. Wölfling, B. C. Chieng, M. J. Christie, I. A. Napier, A. Eckert, M. Staufenbiel, E. Hardeman y J. Götz (2010). «Dendritic function of tau mediates amyloid- $\beta$  toxicity in Alzheimer's disease mouse models». En: *Cell* 142(3):387-397. DOI: [10.1016/j.cell.2010.06.036](https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.06.036).
- Jacobowitz, D. M. y L. Winsky (1991). «Immunocytochemical localization of calretinin in the forebrain of the rat». En: *J. Comp. Neurol.* 304(2):198-218. DOI: [10.1002/cne.903040205](https://doi.org/10.1002/cne.903040205).
- Jin, K., V. Galvan, L. Xie, X. O. Mao, O. F. Gorostiza, D. E. Bredesen y D. A. Greenberg (2004). «Enhanced neurogenesis in Alzheimer's disease transgenic (PDGF-APP<sub>Sw,Ind</sub>) mice». En: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(36):13363-13367. DOI: [10.1073/pnas.0403678101](https://doi.org/10.1073/pnas.0403678101).
- Jin, K., A. L. Peel, X. O. Mao, L. Xie, B. A. Cottrell, D. C. Henshall y D. A. Greenberg (2004). «Increased hippocampal neurogenesis in Alzheimer's disease». En: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(1):343-347. DOI: [10.1073/pnas.2634794100](https://doi.org/10.1073/pnas.2634794100).

- Jin, K., X. Wang, L. Xie, X. O. Mao, W. Zhu, Y. Wang, J. Shen, Y. Mao, S. Banwait y D. A. Greenberg (2006). «Evidence for stroke-induced neurogenesis in the human brain». En: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103(35):13198-13202. DOI: [10.1073/pnas.0603512103](https://doi.org/10.1073/pnas.0603512103).
- Johns, P. (2014). «Ch. 12: Dementia». En: *Clinical Neuroscience*. Londres (Reino Unido): Churchill Livingstone (Elsevier), págs. 145-162. DOI: [10.1016/B978-0-443-10321-6.00012-6](https://doi.org/10.1016/B978-0-443-10321-6.00012-6).
- Jones, S. P., O. Rahimi, M. P. O'Boyle, D. L. Diaz y B. J. Claiborne (2003). «Maturation of granule cell dendrites after mossy fiber arrival in hippocampal field CA3». En: *Hippocampus* 13(3):413-427. DOI: [10.1002/hipo.10121](https://doi.org/10.1002/hipo.10121).
- Jonsson, T., H. Stefansson, S. Steinberg, I. Jonsdottir, P. V. Jonsson, J. Snaedal, S. Bjornsson, J. Huttenlocher, A. I. Levey, J. J. Lah, D. Rujescu, H. Hampel, I. Giegling, O. A. Andreassen, K. Engedal, I. Ulstein, S. Djurovic, C. Ibrahim-Verbaas, A. Hofman, M. A. Ikram, C. M. van Duijn, U. Thorsteinsdottir, A. Kong y K. Stefansson (2013). «Variant of TREM2 associated with the risk of Alzheimer's disease». En: *N. Engl. J. Med.* 368(2):107-116. DOI: [10.1056/NEJMoa1211103](https://doi.org/10.1056/NEJMoa1211103).
- Kametani, F. y M. Hasegawa (2018). «Reconsideration of Amyloid Hypothesis and Tau Hypothesis in Alzheimer's Disease». En: *Front. Neurosci.* 12:25. DOI: [10.3389/fnins.2018.00025](https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00025).
- Karch, C. M., A. T. Jeng y A. M. Goate (2012). «Extracellular Tau levels are influenced by variability in Tau that is associated with tauopathies». En: *J. Biol. Chem.* 287(51):42751-42762. DOI: [10.1074/jbc.M112.380642](https://doi.org/10.1074/jbc.M112.380642).
- Kelsch, W., C. W. Lin y C. Lois (2008). «Sequential development of synapses in dendritic domains during adult neurogenesis». En: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105(43):16803-16808. DOI: [10.1073/pnas.0807970105](https://doi.org/10.1073/pnas.0807970105).
- Kempermann, G., S. Jessberger, B. Steiner y G. Kronenberg (2004). «Milestones of neuronal development in the adult hippocampus». En: *Trends Neurosci.* 27(8):447-452. DOI: [10.1016/j.tins.2004.05.013](https://doi.org/10.1016/j.tins.2004.05.013).
- Kempermann, G., H. G. Kuhn y F. H. Gage (1997). «Genetic influence on neurogenesis in the dentate gyrus of adult mice». En: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94(19):10409-10414. DOI: [10.1073/pnas.94.19.10409](https://doi.org/10.1073/pnas.94.19.10409).
- Kim, Y., H. Choi, W. Lee, H. Park, T. I. Kam, S. H. Hong, J. Nah, S. Jung, B. Shin, H. Lee, T. Y. Choi, H. Choo, K. K. Kim, S. Y. Choi, R. Kaye y Y. K. Jung (2016). «Caspase-cleaved tau exhibits rapid memory impairment associated with tau oligomers in a transgenic mouse model». En: *Neurobiol. Dis.* 87:19-28. DOI: [10.1016/j.nbd.2015.12.006](https://doi.org/10.1016/j.nbd.2015.12.006).
- Kimura, T., D. J. Whitcomb, J. Jo, P. Regan, T. Piers, S. Heo, C. Brown, T. Hashikawa, M. Murayama, H. Seok, I. Sotiropoulos, E. Kim, G. L. Collingridge, A. Takashima y K. Cho (2014). «Microtubule-associated protein tau is essential for long-term depression in the hippocampus». En: *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 369(1633):20130144. DOI: [10.1098/rstb.2013.0144](https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0144).
- Knops, J., K. S. Kosik, G. Lee, J. D. Pardee, L. Cohen-Gould y L. McConlogue (1991). «Overexpression of tau in a nonneuronal cell induces long cellular processes». En: *J. Cell Biol.* 114(4):725-733. DOI: [10.1083/jcb.114.4.725](https://doi.org/10.1083/jcb.114.4.725).
- Koivisto, H., E. Ytebrouck, S. Carmans, R. Naderi, P. O. Miettinen, B. Roucourt y H. Tanila (2019). «Progressive age-dependent motor impairment in human tau P301S overexpressing mice». En: *Behav. Brain Res.* 376:112158. DOI: [10.1016/j.bbr.2019.112158](https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112158).
- Komuro, Y., G. Xu, K. Bhaskar y B. T. Lamb (2015). «Human tau expression reduces adult neurogenesis in a mouse model of tauopathy». En: *Neurobiol. Aging* 36(6):2034-2042. DOI: [10.1016/j.neurobiolaging.2015.03.002](https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2015.03.002).
- Kraepelin, E. (1910). «Klinische Psychiatrie». En: *Psychiatrie. Ein Lehrbuch für Studierende und Ärzte*. Ed. por J. Barth. 8.<sup>a</sup> ed. Vol. 2. Leipzig (Alemania).

- Krishnan, V. S., Z. White, C. D. McMahon, S. I. Hodgetts, M. Fitzgerald, T. Shavlakadze, A. R. Harvey y M. D. Grounds (2016). «A Neurogenic Perspective of Sarcopenia: Time Course Study of Sciatic Nerves From Aging Mice». En: *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 75(5):464-478. DOI: [10.1093/jnen/nlw019](https://doi.org/10.1093/jnen/nlw019).
- Lee, M. J., J. H. Lee y D. C. Rubinsztein (2013). «Tau degradation: the ubiquitin-proteasome system versus the autophagy-lysosome system». En: *Prog. Neurobiol.* 105:49-59. DOI: [10.1016/j.pneurobio.2013.03.001](https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.03.001).
- Lee, V. M. y J. Q. Trojanowski (1999). «Neurodegenerative tauopathies: human disease and transgenic mouse models». En: *Neuron* 24(3):507-510. DOI: [10.1016/S0896-6273\(00\)81106-X](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)81106-X).
- Lewis, J., E. McGowan, J. Rockwood, H. Melrose, P. Nacharaju, M. Van Slegtenhorst, K. Gwinn-Hardy, M. Paul Murphy, M. Baker, X. Yu, K. Duff, J. Hardy, A. Corral, W. L. Lin, S. H. Yen, D. W. Dickson, P. Davies y M. Hutton (2000). «Neurofibrillary tangles, amyotrophy and progressive motor disturbance in mice expressing mutant (P301L) tau protein». En: *Nat. Genet.* 25(4):402-405. DOI: [10.1038/78078](https://doi.org/10.1038/78078).
- Lim, F., F. Hernández, J. J. Lucas, P. Gómez-Ramos, M. A. Morán y J. Ávila (2001). «FTDP-17 mutations in tau transgenic mice provoke lysosomal abnormalities and Tau filaments in forebrain». En: *Mol. Cell. Neurosci.* 18(6):702-714. DOI: [10.1006/mcne.2001.1051](https://doi.org/10.1006/mcne.2001.1051).
- Liu, F., I. Grundke-Iqbal, K. Iqbal y C. X. Gong (2005). «Contributions of protein phosphatases PP1, PP2A, PP2B and PP5 to the regulation of tau phosphorylation». En: *Eur. J. Neurosci.* 22(8):1942-1950. DOI: [10.1111/j.1460-9568.2005.04391.x](https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04391.x).
- Liu, F., Z. Liang y C. X. Gong (2006). «Hyperphosphorylation of tau and protein phosphatases in Alzheimer disease». En: *Panminerva Med.* 48(2):97-108.
- Liu, J., H. K. Nam, C. Campbell, K. C. Gasque, J. L. Millan y N. E. Hatch (2014). «Tissue-nonspecific alkaline phosphatase deficiency causes abnormal craniofacial bone development in the *Alpl*<sup>(-/-)</sup> mouse model of infantile hypophosphatasia». En: *Bone* 67:81-94. DOI: [10.1016/j.bone.2014.06.040](https://doi.org/10.1016/j.bone.2014.06.040).
- Llorens-Martín, M., A. Fuster-Matanzo, C. M. Teixeira, J. Jurado-Arjona, F. Ulloa, J. Defelipe, A. Rábano, F. Hernández, E. Soriano y J. Ávila (2013). «GSK-3 $\beta$  overexpression causes reversible alterations on postsynaptic densities and dendritic morphology of hippocampal granule neurons *in vivo*». En: *Mol. Psychiatry* 18(4):451-460. DOI: [10.1038/mp.2013.4](https://doi.org/10.1038/mp.2013.4).
- Llorens-Martin, M., F. Hernandez y J. Avila (2011). «Expression of frontotemporal dementia with parkinsonism associated to chromosome 17 tau induces specific degeneration of the ventral dentate gyrus and depressive-like behavior in mice». En: *Neuroscience* 196:215-227. DOI: [10.1016/j.neuroscience.2011.08.057](https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.08.057).
- Llorens-Martin, M., C. M. Teixeira, A. Fuster-Matanzo, J. Jurado-Arjona, V. Borrell, E. Soriano, J. Avila y F. Hernández (2012). «Tau isoform with three microtubule binding domains is a marker of new axons generated from the subgranular zone in the hippocampal dentate gyrus: implications for Alzheimer's disease». En: *J. Alzheimers Dis.* 29(4):921-930. DOI: [10.3233/JAD-2012-112057](https://doi.org/10.3233/JAD-2012-112057).
- Lopes, S., A. Lopes, V. Pinto, M. R. Guimarães, V. M. Sardinha, S. Duarte-Silva, S. Pinheiro, J. Pizarro, J. F. Oliveira, N. Sousa, H. Leite-Almeida e I. Sotiropoulos (2016). «Absence of Tau triggers age-dependent sciatic nerve morphofunctional deficits and motor impairment». En: *Aging Cell* 15(2):208-216. DOI: [10.1111/ace1.12391](https://doi.org/10.1111/ace1.12391).
- LoPresti, P., S. Szuchet, S. C. Papasozomenos, R. P. Zinkowski y L. I. Binder (1995). «Functional implications for the microtubule-associated protein tau: localization in oligodendrocytes». En: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92(22):10369-10373. DOI: [10.1073/pnas.92.22.10369](https://doi.org/10.1073/pnas.92.22.10369).
- Lossos, A., A. Reches, A. Gal, J. P. Newman, D. Soffer, J. M. Gomori, M. Boher, D. Ekstein, I. Biran, Z. Meiner, O. Abramsky y H. Rosenmann (2003). «Frontotemporal dementia and parkinsonism with the P301S *tau* gene mutation in a Jewish family». En: *J. Neurol.* 250(6):733-740. DOI: [10.1007/s00415-003-1074-4](https://doi.org/10.1007/s00415-003-1074-4).

- Lucas, J. J., F. Hernández, P. Gómez-Ramos, M. A. Morán, R. Hen y J. Avila (2001). «Decreased nuclear  $\beta$ -catenin, tau hyperphosphorylation and neurodegeneration in GSK-3 $\beta$  conditional transgenic mice». En: *EMBO J.* 20(1-2):27-39. DOI: [10.1093/emboj/20.1.27](https://doi.org/10.1093/emboj/20.1.27).
- Luo, H. B., Y. Y. Xia, X. J. Shu, Z. C. Liu, Y. Feng, X. H. Liu, G. Yu, G. Yin, Y. S. Xiong, K. Zeng, J. Jiang, K. Ye, X. C. Wang y J. Z. Wang (2014). «SUMOylation at K340 inhibits tau degradation through deregulating its phosphorylation and ubiquitination». En: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111(46):16586-16591. DOI: [10.1073/pnas.1417548111](https://doi.org/10.1073/pnas.1417548111).
- Mann, D. M., J. Lincoln, P. O. Yates, J. E. Stamp y S. Toper (1980). «Changes in the monoamine containing neurones of the human CNS in senile dementia». En: *Br. J. Psychiatry* 136:533-541. DOI: [10.1192/bjp.136.6.533](https://doi.org/10.1192/bjp.136.6.533).
- Martin, L., X. Latypova y F. Terro (2011). «Post-translational modifications of tau protein: implications for Alzheimer's disease». En: *Neurochem. Int.* 58(4):458-471. DOI: [10.1016/j.neuint.2010.12.023](https://doi.org/10.1016/j.neuint.2010.12.023).
- Martino, G. y S. Pluchino (2007). «Neural stem cells: guardians of the brain». En: *Nat. Cell Biol.* 9(9):1031-1034. DOI: [10.1038/ncb0907-1031](https://doi.org/10.1038/ncb0907-1031).
- Medina, M., F. Hernández y J. Avila (2016). «New Features about Tau Function and Dysfunction». En: *Biomolecules* 6(2). DOI: [10.3390/biom6020021](https://doi.org/10.3390/biom6020021).
- Meijering, E., M. Jacob, J. C. Sarria, P. Steiner, H. Hirling y M. Unser (2004). «Design and validation of a tool for neurite tracing and analysis in fluorescence microscopy images». En: *Cytometry A* 58(2):167-176. DOI: [10.1002/cyto.a.20022](https://doi.org/10.1002/cyto.a.20022).
- Miettinen, R., A. I. Gulyás, K. G. Baimbridge, D. M. Jacobowitz y T. F. Freund (1992). «Calretinin is present in non-pyramidal cells of the rat hippocampus—II. Co-existence with other calcium binding proteins and GABA». En: *Neuroscience* 48(1):29-43. DOI: [10.1016/0306-4522\(92\)90335-y](https://doi.org/10.1016/0306-4522(92)90335-y).
- Millán, J. L. (2006). *Mammalian Alkaline Phosphatases: From Biology to Applications in Medicine and Biotechnology*. Weinheim (Alemania): Wiley-VCH. DOI: [10.1002/3527608060](https://doi.org/10.1002/3527608060).
- Min, S. W., X. Chen, T. E. Tracy, Y. Li, Y. Zhou, C. Wang, K. Shirakawa, S. S. Minami, E. Defensor, S. A. Mok, P. D. Sohn, B. Schilling, X. Cong, L. Ellerby, B. W. Gibson, J. Johnson, N. Krogan, M. Shamloo, J. Gestwicki, E. Masliah, E. Verdin y L. Gan (2015). «Critical role of acetylation in tau-mediated neurodegeneration and cognitive deficits». En: *Nat. Med.* 21(10):1154-1162. DOI: [10.1038/nm.3951](https://doi.org/10.1038/nm.3951).
- Min, S. W., S. H. Cho, Y. Zhou, S. Schroeder, V. Haroutunian, W. W. Seeley, E. J. Huang, Y. Shen, E. Masliah, C. Mukherjee, D. Meyers, P. A. Cole, M. Ott y L. Gan (2010). «Acetylation of tau inhibits its degradation and contributes to tauopathy». En: *Neuron* 67(6):953-966. DOI: [10.1016/j.neuron.2010.08.044](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.08.044).
- Ming, G. L. y H. Song (2005). «Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system». En: *Annu. Rev. Neurosci.* 28:223-250. DOI: [10.1146/annurev.neuro.28.051804.101459](https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.28.051804.101459).
- Miras-Portugal, M. T., A. Sebastián-Serrano, L. de Diego García y M. Díaz-Hernández (2017). «Neuronal P2X7 Receptor: Involvement in Neuronal Physiology and Pathology». En: *J. Neurosci.* 37(30):7063-7072. DOI: [10.1523/JNEUROSCI.3104-16.2017](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3104-16.2017).
- Mironov Jr., A., D. Latawiec, H. Wille, E. Bouzamondo-Bernstein, G. Legname, R. A. Williamson, D. Burton, S. J. DeArmond, S. B. Prusiner y P. J. Peters (2003). «Cytosolic prion protein in neurons». En: *J. Neurosci.* 23(18):7183-7193. DOI: [10.1523/JNEUROSCI.23-18-07183.2003](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-18-07183.2003).
- Mohamed, N. V., T. Herrou, V. Plouffe, N. Piperno y N. Leclerc (2013). «Spreading of tau pathology in Alzheimer's disease by cell-to-cell transmission». En: *Eur. J. Neurosci.* 37(12):1939-1948. DOI: [10.1111/ejn.12229](https://doi.org/10.1111/ejn.12229).

- Moreno-Jiménez, E. P., M. Flor-García, J. Terreros-Roncal, A. Rábano, F. Cafini, N. Pallas-Bazarra, J. Ávila y M. Llorens-Martín (2019). «Adult hippocampal neurogenesis is abundant in neurologically healthy subjects and drops sharply in patients with Alzheimer's disease». En: *Nat. Med.* 25(4):554-560. DOI: [10.1038/s41591-019-0375-9](https://doi.org/10.1038/s41591-019-0375-9).
- Morris, R. G. M. (1983). «An attempt to dissociate “spatial-mapping” and “working-memory” theories of hippocampal function». En: *Neurobiology of the hippocampus*. Ed. por W. Seifert. Londres (Reino Unido): Academic Press, págs. 405-430.
- Moser, M., R. J. Colello, U. Pott y B. Oesch (1995). «Developmental expression of the prion protein gene in glial cells». En: *Neuron* 14(3):509-517. DOI: [10.1016/0896-6273\(95\)90307-0](https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90307-0).
- Moya, K. L., R. Hässig, K. C. Breen, H. Volland y L. Di Giamberardino (2005). «Axonal transport of the cellular prion protein is increased during axon regeneration». En: *J. Neurochem.* 92(5):1044-1053. DOI: [10.1111/j.1471-4159.2004.02940.x](https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02940.x).
- Mullis, K. B. y F. A. Faloona (1987). «Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction». En: *Methods Enzymol.* 155:335-350. DOI: [10.1016/0076-6879\(87\)55023-6](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)55023-6).
- Narisawa, S., N. Frohlander y J. L. Millán (1997). «Inactivation of two mouse alkaline phosphatase genes and establishment of a model of infantile hypophosphatasia». En: *Dev. Dyn.* 208(3):432-446. DOI: [10.1002/\(SICI\)1097-0177\(199703\)208:3<432::AID-AJA13>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0177(199703)208:3<432::AID-AJA13>3.0.CO;2-1).
- Oddo, S., A. Caccamo, J. D. Shepherd, M. P. Murphy, T. E. Golde, R. Kaye, R. Metherate, M. P. Mattson, Y. Akbari y F. M. LaFerla (2003). «Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular A $\beta$  and synaptic dysfunction». En: *Neuron* 39(3):409-421. DOI: [10.1016/S0896-6273\(03\)00434-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00434-3).
- Ossola, B., C. Zhao, A. Compston, S. Pluchino, R. J. Franklin y M. G. Spillantini (2016). «Neuronal expression of pathological tau accelerates oligodendrocyte progenitor cell differentiation». En: *Glia* 64(3):457-471. DOI: [10.1002/glia.22940](https://doi.org/10.1002/glia.22940).
- Pallas-Bazarra, N., J. Jurado-Arjona, M. Navarrete, J. A. Esteban, F. Hernández, J. Ávila y M. Llorens-Martín (2016). «Novel function of Tau in regulating the effects of external stimuli on adult hippocampal neurogenesis». En: *EMBO J.* 35(13):1417-1436. DOI: [10.15252/embj.201593518](https://doi.org/10.15252/embj.201593518).
- Pekny, M. y M. Pekna (2014). «Astrocyte reactivity and reactive astrogliosis: costs and benefits». En: *Physiol. Rev.* 94(4):1077-1098. DOI: [10.1152/physrev.00041.2013](https://doi.org/10.1152/physrev.00041.2013).
- Perez-Gonzalez, R., S. A. Gauthier, A. Kumar y E. Levy (2012). «The exosome secretory pathway transports amyloid precursor protein carboxyl-terminal fragments from the cell into the brain extracellular space». En: *J. Biol. Chem.* 287(51):43108-43115. DOI: [10.1074/jbc.M112.404467](https://doi.org/10.1074/jbc.M112.404467).
- Pérez, M., R. Cuadros y M. Medina (2018). «Tau Assembly into Filaments». En: *Methods Mol. Biol.* 1779:447-461. DOI: [10.1007/978-1-4939-7816-8\\_27](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7816-8_27).
- Pérez, M., M. Medina, F. Hernández y J. Ávila (2018). «Secretion of full-length Tau or Tau fragments in cell culture models. Propagation of Tau in vivo and in vitro». En: *Biomol. Concepts* 9(1):1-11. DOI: [10.1515/bmc-2018-0001](https://doi.org/10.1515/bmc-2018-0001).
- Pernègre, C., A. Duquette y N. Leclerc (2019). «Tau Secretion: Good and Bad for Neurons». En: *Front. Neurosci.* 13:649. DOI: [10.3389/fnins.2019.00649](https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00649).
- Plouffe, V., N. V. Mohamed, J. Rivest-McGraw, J. Bertrand, M. Lauzon y N. Leclerc (2012). «Hyperphosphorylation and cleavage at D421 enhance tau secretion». En: *PLoS One* 7(5). DOI: [10.1371/journal.pone.0036873](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036873).
- Pooler, A. M., E. C. Phillips, D. H. Lau, W. Noble y D. P. Hanger (2013). «Physiological release of endogenous tau is stimulated by neuronal activity». En: *EMBO Rep.* 14(4):389-394. DOI: [10.1038/embor.2013.15](https://doi.org/10.1038/embor.2013.15).



- Probst, A., J. Götz, K. H. Wiederhold, M. Tolnay, C. Mistl, A. L. Jaton, M. Hong, T. Ishihara, V. M. Lee, J. Q. Trojanowski, R. Jakes, R. A. Crowther, M. G. Spillantini, K. Bürki y M. Goedert (2000). «Axonopathy and amyotrophy in mice transgenic for human four-repeat tau protein». En: *Acta Neuropathol.* 99(5):469-481. DOI: [10.1007/s004010051148](https://doi.org/10.1007/s004010051148).
- Rajendran, L., M. Honsho, T. R. Zahn, P. Keller, K. D. Geiger, P. Verkade y K. Simons (2006). «Alzheimer's disease  $\beta$ -amyloid peptides are released in association with exosomes». En: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103(30):11172-11177. DOI: [10.1073/pnas.0603838103](https://doi.org/10.1073/pnas.0603838103).
- Robertson, L. A., K. L. Moya y K. C. Breen (2004). «The potential role of tau protein O-glycosylation in Alzheimer's disease». En: *J. Alzheimers Dis.* 6(5):489-495. DOI: [10.3233/JAD-2004-6505](https://doi.org/10.3233/JAD-2004-6505).
- Rodríguez, J. J., V. C. Jones, M. Tabuchi, S. M. Allan, E. M. Knight, F. M. LaFerla, S. Oddo y A. Verkhratsky (2008). «Impaired adult neurogenesis in the dentate gyrus of a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease». En: *PLoS One* 3(8):e2935. DOI: [10.1371/journal.pone.0002935](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002935).
- Roy, S., B. Zhang, V. M. Lee y J. Q. Trojanowski (2005). «Axonal transport defects: a common theme in neurodegenerative diseases». En: *Acta Neuropathol.* 109(1):5-13. DOI: [10.1007/s00401-004-0952-x](https://doi.org/10.1007/s00401-004-0952-x).
- Russo, I., S. Barlati y F. Bosetti (2011). «Effects of neuroinflammation on the regenerative capacity of brain stem cells». En: *J. Neurochem.* 116(6):947-956. DOI: [10.1111/j.1471-4159.2010.07168.x](https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.07168.x).
- Sahay, A., K. N. Scobie, A. S. Hill, C. M. O'Carroll, M. A. Kheirbek, N. S. Burghardt, A. A. Fenton, A. Dranovsky y R. Hen (2011). «Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to improve pattern separation». En: *Nature* 472(7344):466-470. DOI: [10.1038/nature09817](https://doi.org/10.1038/nature09817).
- Saman, S., W. Kim, M. Raya, Y. Visnick, S. Miro, S. Saman, B. Jackson, A. C. McKee, V. E. Alvarez, N. C. Lee y G. F. Hall (2012). «Exosome-associated tau is secreted in tauopathy models and is selectively phosphorylated in cerebrospinal fluid in early Alzheimer disease». En: *J. Biol. Chem.* 287(6):3842-3849. DOI: [10.1074/jbc.M111.277061](https://doi.org/10.1074/jbc.M111.277061).
- Santacruz, K., J. Lewis, T. Spire, J. Paulson, L. Kotilinek, M. Ingelsson, A. Guimaraes, M. DeTure, M. Ramsden, E. McGowan, C. Forster, M. Yue, J. Orne, C. Janus, A. Mariash, M. Kuskowski, B. Hyman, M. Hutton y K. H. Ashe (2005). «Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function». En: *Science* 309(5733):476-481. DOI: [10.1126/science.1113694](https://doi.org/10.1126/science.1113694).
- Sardar Sinha, M., A. Ansell-Schultz, L. Civitelli, C. Hildesjö, M. Larsson, L. Lannfelt, M. Ingelsson y M. Hallbeck (2018). «Alzheimer's disease pathology propagation by exosomes containing toxic amyloid-beta oligomers». En: *Acta Neuropathol.* 136(1):41-56. DOI: [10.1007/s00401-018-1868-1](https://doi.org/10.1007/s00401-018-1868-1).
- Scattoni, M. L., L. Gasparini, E. Alleva, M. Goedert, G. Calamandrei y M. G. Spillantini (2010). «Early behavioural markers of disease in P301S tau transgenic mice». En: *Behav. Brain Res.* 208(1):250-257. DOI: [10.1016/j.bbr.2009.12.002](https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.12.002).
- Schindelin, J., I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld, B. Schmid, J. Y. Tinevez, D. J. White, V. Hartenstein, K. Eliceiri, P. Tomancak y A. Cardona (2012). «Fiji: an open-source platform for biological-image analysis». En: *Nat. Methods* 9(7):676-682. DOI: [10.1038/nmeth.2019](https://doi.org/10.1038/nmeth.2019).
- Selkoe, D. J. (1991). «The molecular pathology of Alzheimer's disease». En: *Neuron* 6(4):487-498. DOI: [10.1016/0896-6273\(91\)90052-2](https://doi.org/10.1016/0896-6273(91)90052-2).
- Selkoe, D. J. (2001). «Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy». En: *Physiol. Rev.* 81(2):741-766. DOI: [10.1152/physrev.2001.81.2.741](https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.2.741).
- Selkoe, D. J. y J. Hardy (2016). «The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years». En: *EMBO Mol. Med.* 8(6):595-608. DOI: [10.15252/emmm.201606210](https://doi.org/10.15252/emmm.201606210).



- Seri, B., J. M. García-Verdugo, L. Collado-Morente, B. S. McEwen y A. Alvarez-Buylla (2004). «Cell types, lineage, and architecture of the germinal zone in the adult dentate gyrus». En: *J. Comp. Neurol.* 478(4):359-378. DOI: [10.1002/cne.20288](https://doi.org/10.1002/cne.20288).
- Servier (2019). *Servier Medical Art*. <https://smart.servier.com/>. Licencia Creative Commons Attribution 3.0 Unported.
- Sharples, R. A., L. J. Vella, R. M. Nisbet, R. Naylor, K. Perez, K. J. Barnham, C. L. Masters y A. F. Hill (2008). «Inhibition of  $\gamma$ -secretase causes increased secretion of amyloid precursor protein C-terminal fragments in association with exosomes». En: *FASEB. J.* 22(5):1469-1478. DOI: [10.1096/fj.07-9357com](https://doi.org/10.1096/fj.07-9357com).
- Shi, Y., K. Yamada, S. A. Liddelow, S. T. Smith, L. Zhao, W. Luo, R. M. Tsai, S. Spina, L. T. Grinberg, J. C. Rojas, G. Gallardo, K. Wang, J. Roh, G. Robinson, M. B. Finn, H. Jiang, P. M. Sullivan, C. Baufeld, M. W. Wood, C. Sutphen, L. McCue, C. Xiong, J. L. Del-Aguila, J. C. Morris, C. Cruchaga, Initiative Alzheimer's Disease Neuroimaging, A. M. Fagan, B. L. Miller, A. L. Boxer, W. W. Seeley, O. Butovsky, B. A. Barres, S. M. Paul y D. M. Holtzman (2017). «ApoE4 markedly exacerbates tau-mediated neurodegeneration in a mouse model of tauopathy». En: *Nature* 549(7673):523-527. DOI: [10.1038/nature24016](https://doi.org/10.1038/nature24016).
- Simón, D., E. García-García, F. Royo, J. M. Falcón-Pérez y J. Avila (2012). «Proteostasis of tau. Tau overexpression results in its secretion via membrane vesicles». En: *FEBS Lett.* 586(1):47-54. DOI: [10.1016/j.febslet.2011.11.022](https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.11.022).
- Snyder, J. S., R. Radik, J. M. Wojtowicz y H. A. Cameron (2009). «Anatomical gradients of adult neurogenesis and activity: young neurons in the ventral dentate gyrus are activated by water maze training». En: *Hippocampus* 19(4):360-370. DOI: [10.1002/hipo.20525](https://doi.org/10.1002/hipo.20525).
- Sorrells, S. F., M. F. Paredes, A. Cebrian-Silla, K. Sandoval, D. Qi, K. W. Kelley, D. James, S. Mayer, J. Chang, K. I. Auguste, E. F. Chang, A. J. Gutierrez, A. R. Kriegstein, G. W. Mathern, M. C. Oldham, E. J. Huang, J. M. Garcia-Verdugo, Z. Yang y A. Alvarez-Buylla (2018). «Human hippocampal neurogenesis drops sharply in children to undetectable levels in adults». En: *Nature* 555(7696):377-381. DOI: [10.1038/nature25975](https://doi.org/10.1038/nature25975).
- Sperfeld, A. D., M. B. Collatz, H. Baier, M. Palmbach, A. Storch, J. Schwarz, K. Tatsch, S. Reske, M. Joosse, P. Heutink y A. C. Ludolph (1999). «FTDP-17: an early-onset phenotype with parkinsonism and epileptic seizures caused by a novel mutation». En: *Ann. Neurol.* 46(5):708-715. DOI: [10.1002/1531-8249\(199911\)46:5<708::AID-ANA5>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/1531-8249(199911)46:5<708::AID-ANA5>3.0.CO;2-K).
- Spittaels, K., C. Van den Haute, J. Van Dorpe, K. Bruynseels, K. Vandezande, I. Laenen, H. Geerts, M. Mercken, R. Sciot, A. Van Lommel, R. Loos y F. Van Leuven (1999). «Prominent axonopathy in the brain and spinal cord of transgenic mice overexpressing four-repeat human tau protein». En: *Am. J. Pathol.* 155(6):2153-2165. DOI: [10.1016/S0002-9440\(10\)65533-2](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65533-2).
- Stamer, K., R. Vogel, E. Thies, E. Mandelkow y E. M. Mandelkow (2002). «Tau blocks traffic of organelles, neurofilaments, and APP vesicles in neurons and enhances oxidative stress». En: *J. Cell Biol.* 156(6):1051-1063. DOI: [10.1083/jcb.200108057](https://doi.org/10.1083/jcb.200108057).
- Steele, A. D., J. G. Emsley, P. H. Özdinler, S. Lindquist y J. D. Macklis (2006). «Prion protein (PrP<sup>c</sup>) positively regulates neural precursor proliferation during developmental and adult mammalian neurogenesis». En: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103(9):3416-3421. DOI: [10.1073/pnas.0511290103](https://doi.org/10.1073/pnas.0511290103).
- Stokin, G. B. y L. S. Goldstein (2006). «Axonal transport and Alzheimer's disease». En: *Annu. Rev. Biochem.* 75:607-627. DOI: [10.1146/annurev.biochem.75.103004.142637](https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.103004.142637).
- Strittmatter, W. J., A. M. Saunders, D. Schmechel, M. Pericak-Vance, J. Enghild, G. S. Salvesen y A. D. Roses (1993). «Apolipoprotein E: High-avidity binding to  $\beta$ -amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease». En: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90(5):1977-1981. DOI: [10.1073/pnas.90.5.1977](https://doi.org/10.1073/pnas.90.5.1977).

- Sultan, A., F. Nessler, M. Violet, S. Begard, A. Loyens, S. Talahari, Z. Mansuroglu, D. Marzin, N. Sergeant, S. Humez, M. Colin, E. Bonnefoy, L. Buee y M. C. Galas (2011). «Nuclear tau, a key player in neuronal DNA protection». En: *J. Biol. Chem.* 286(6):4566-4575. DOI: [10.1074/jbc.M110.199976](https://doi.org/10.1074/jbc.M110.199976).
- Swanson, E., L. Breckenridge, L. McMahon, S. Som, I. McConnell y G. S. Bloom (2017). «Extracellular Tau Oligomers Induce Invasion of Endogenous Tau into the Somatodendritic Compartment and Axonal Transport Dysfunction». En: *J. Alzheimers Dis.* 58(3):803-820. DOI: [10.3233/JAD-170168](https://doi.org/10.3233/JAD-170168).
- Swieten, J. C. van, I. F. Bronner, A. Azmani, L. A. Severijnen, W. Kamphorst, R. Ravid, P. Rizzu, R. Willemsen y P. Heutink (2007). «The  $\Delta$ K280 mutation in MAP tau favors exon 10 skipping in vivo». En: *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 66(1):17-25. DOI: [10.1097/nen.0b013e31802c39a4](https://doi.org/10.1097/nen.0b013e31802c39a4).
- Takeuchi, H., M. Iba, H. Inoue, M. Higuchi, K. Takao, K. Tsukita, Y. Karatsu, Y. Iwamoto, T. Miyakawa, T. Suhara, J. Q. Trojanowski, V. M. Lee y R. Takahashi (2011). «P301S mutant human tau transgenic mice manifest early symptoms of human tauopathies with dementia and altered sensorimotor gating». En: *PLoS One* 6(6):e21050. DOI: [10.1371/journal.pone.0021050](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021050).
- Taylor, S. E., C. Morganti-Kossmann, J. Lifshitz y J. M. Ziebell (2014). «Rod microglia: a morphological definition». En: *PLoS One* 9(5):e97096. DOI: [10.1371/journal.pone.0097096](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097096).
- Terreros-Roncal, J., M. Flor-García, E. P. Moreno-Jiménez, N. Pallas-Bazarra, A. Rábano, N. Sah, H. van Praag, D. Giacomini, A. F. Schinder, J. Ávila y M. Llorens-Martín (2019). «Activity-dependent reconnection of adult-born dentate granule cells in a mouse model of frontotemporal dementia». En: *J. Neurosci.* DOI: [10.1523/JNEUROSCI.2724-18.2019](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2724-18.2019).
- The Jackson Laboratory (2019). *Mouse Strain Datasheet - 008169*. <https://www.jax.org/strain/008169>.
- Trabzuni, D., S. Wray, J. Vandrovcova, A. Ramasamy, R. Walker, C. Smith, C. Luk, J. R. Gibbs, A. Dillman, D. G. Hernandez, S. Arepalli, A. B. Singleton, M. R. Cookson, A. M. Pittman, R. de Silva, M. E. Weale, J. Hardy y M. Ryten (2012). «MAPT expression and splicing is differentially regulated by brain region: relation to genotype and implication for tauopathies». En: *Hum. Mol. Genet.* 21(18):4094-4103. DOI: [10.1093/hmg/dds238](https://doi.org/10.1093/hmg/dds238).
- Tremblay, P., E. Bouzamondo-Bernstein, C. Heinrich, S. B. Prusiner y S. J. DeArmond (2007). «Developmental expression of PrP in the post-implantation embryo». En: *Brain Res.* 1139:60-67. DOI: [10.1016/j.brainres.2006.12.055](https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.12.055).
- Vagnozzi, A. N., P. F. Giannopoulos y D. Praticò (2018). «Brain 5-lipoxygenase over-expression worsens memory, synaptic integrity, and tau pathology in the P301S mice». En: *Aging Cell* 17(1). DOI: [10.1111/ace1.12695](https://doi.org/10.1111/ace1.12695).
- Vardy, E. R., K. A. Kellett, S. L. Cocklin y N. M. Hooper (2012). «Alkaline phosphatase is increased in both brain and plasma in Alzheimer's disease». En: *Neurodegener. Dis.* 9(1):31-37. DOI: [10.1159/000329722](https://doi.org/10.1159/000329722).
- Vector Labs (2019). *VECTASTAIN Elite ABC Kit protocol*. <https://vectorlabs.com/media/docs/protocols/PK-6100.pdf>.
- Verdaguer, E., S. Brox, D. Petrov, J. Olloquequi, R. Romero, M. L. de Lemos, A. Camins y C. Auladell (2015). «Vulnerability of calbindin, calretinin and parvalbumin in a transgenic/knock-in APPswe/PS1dE9 mouse model of Alzheimer disease together with disruption of hippocampal neurogenesis». En: *Exp. Gerontol.* 69:176-188. DOI: [10.1016/j.exger.2015.06.013](https://doi.org/10.1016/j.exger.2015.06.013).
- Vorhees, C. V. y M. T. Williams (2006). «Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory». En: *Nat. Protoc.* 1(2):848-858. DOI: [10.1038/nprot.2006.116](https://doi.org/10.1038/nprot.2006.116).
- Wang, J. Z., I. Grundke-Iqbal y K. Iqbal (1996). «Glycosylation of microtubule-associated protein tau: an abnormal posttranslational modification in Alzheimer's disease». En: *Nat. Med.* 2(8):871-875. DOI: [10.1038/nm0896-871](https://doi.org/10.1038/nm0896-871).

- Wang, Y., V. Balaji, S. Kaniyappan, L. Kruger, S. Irsen, K. Tepper, R. Chandupatla, W. Maetzler, A. Schneider, E. Mandelkow y E. M. Mandelkow (2017). «The release and trans-synaptic transmission of Tau via exosomes». En: *Mol. Neurodegener.* 12(1). DOI: [10.1186/s13024-016-0143-y](https://doi.org/10.1186/s13024-016-0143-y).
- Wang, Y. y E. Mandelkow (2012). «Degradation of tau protein by autophagy and proteasomal pathways». En: *Biochem. Soc. Trans.* 40(4):644-652. DOI: [10.1042/BST20120071](https://doi.org/10.1042/BST20120071).
- Wang, Y. y E. Mandelkow (2016). «Tau in physiology and pathology». En: *Nat. Rev. Neurosci.* 17(1):5-21. DOI: [10.1038/nrn.2015.1](https://doi.org/10.1038/nrn.2015.1).
- Wang, Y., M. Martinez-Vicente, U. Kruger, S. Kaushik, E. Wong, E. M. Mandelkow, A. M. Cuervo y E. Mandelkow (2009). «Tau fragmentation, aggregation and clearance: the dual role of lysosomal processing». En: *Hum. Mol. Genet.* 18(21):4153-4170. DOI: [10.1093/hmg/ddp367](https://doi.org/10.1093/hmg/ddp367).
- Weingarten, M. D., A. H. Lockwood, S. Y. Hwo y M. W. Kirschner (1975). «A protein factor essential for microtubule assembly». En: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72(5):1858-1862. DOI: [10.1073/pnas.72.5.1858](https://doi.org/10.1073/pnas.72.5.1858).
- Weiss, M. J., K. Ray, P. S. Henthorn, B. Lamb, T. Kadesch y H. Harris (1988). «Structure of the human liver/bone/kidney alkaline phosphatase gene». En: *J. Biol. Chem.* 263(24):12002-12010.
- Winston, C. N., E. J. Goetzl, L. D. Baker, M. V. Vitiello y R. A. Rissman (2018). «Growth Hormone-Releasing Hormone Modulation of Neuronal Exosome Biomarkers in Mild Cognitive Impairment». En: *J. Alzheimers Dis.* 66(3):971-981. DOI: [10.3233/JAD-180302](https://doi.org/10.3233/JAD-180302).
- Wirths, O. (2017). «Altered neurogenesis in mouse models of Alzheimer disease». En: *Neurogenesis (Austin)* 4(1). DOI: [10.1080/23262133.2017.1327002](https://doi.org/10.1080/23262133.2017.1327002).
- Wszolek, Z. K., Y. Tsuboi, B. Ghetti, S. Pickering-Brown, Y. Baba y W. P. Cheshire (2006). «Frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17 (FTDP-17)». En: *Orphanet J. Rare Dis.* 1:30. DOI: [10.1186/1750-1172-1-30](https://doi.org/10.1186/1750-1172-1-30).
- Wu, J. W., M. Herman, L. Liu, S. Simoes, C. M. Acker, H. Figueroa, J. I. Steinberg, M. Margittai, R. Kaye, C. Zurzolo, G. Di Paolo y K. E. Duff (2013). «Small misfolded Tau species are internalized via bulk endocytosis and anterogradely and retrogradely transported in neurons». En: *J. Biol. Chem.* 288(3):1856-1870. DOI: [10.1074/jbc.M112.394528](https://doi.org/10.1074/jbc.M112.394528).
- Wulf, M. A., A. Senatore y A. Aguzzi (2017). «The biological function of the cellular prion protein: an update». En: *BMC Biol.* 15(1):34. DOI: [10.1186/s12915-017-0375-5](https://doi.org/10.1186/s12915-017-0375-5).
- Xu, H., T. W. Rösler, T. Carlsson, A. de Andrade, J. Bruch, M. Höllerhage, W. H. Oertel y G. U. Höglinger (2014). «Memory deficits correlate with tau and spine pathology in P301S *MAPT* transgenic mice». En: *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 40(7):833-843. DOI: [10.1111/nan.12160](https://doi.org/10.1111/nan.12160).
- Yamada, K., J. R. Cirrito, F. R. Stewart, H. Jiang, M. B. Finn, B. B. Holmes, L. I. Binder, E. M. Mandelkow, M. I. Diamond, V. M. Lee y D. M. Holtzman (2011). «In vivo microdialysis reveals age-dependent decrease of brain interstitial fluid tau levels in P301S human tau transgenic mice». En: *J. Neurosci.* 31(37):13110-13117. DOI: [10.1523/JNEUROSCI.2569-11.2011](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2569-11.2011).
- Yasuda, M., K. Yokoyama, T. Nakayasu, Y. Nishimura, M. Matsui, T. Yokoyama, K. Miyoshi y C. Tanaka (2000). «A Japanese patient with frontotemporal dementia and parkinsonism by a tau P301S mutation». En: *Neurology* 55(8):1224-1227. DOI: [10.1212/wnl.55.8.1224](https://doi.org/10.1212/wnl.55.8.1224).
- Yin, Z., F. Valkenburg, B. E. Hornix, I. Mantingh-Otter, X. Zhou, M. Mari, F. Reggiori, D. Van Dam, B. J. L. Eggen, P. P. De Deyn y E. Boddeke (2017). «Progressive Motor Deficit is Mediated by the Denervation of Neuromuscular Junctions and Axonal Degeneration in Transgenic Mice Expressing Mutant (P301S) Tau Protein». En: *J. Alzheimers Dis.* 60(s.1):S41-S57. DOI: [10.3233/JAD-161206](https://doi.org/10.3233/JAD-161206).
- Yoshiyama, Y., M. Higuchi, B. Zhang, S. M. Huang, N. Iwata, T. C. Saido, J. Maeda, T. Suhara, J. Q. Trojanowski y V. M. Lee (2007). «Synapse loss and microglial activation precede tangles in a P301S tauopathy mouse model». En: *Neuron* 53(3):337-351. DOI: [10.1016/j.neuron.2007.01.010](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.01.010).

- Zempel, H., E. Thies, E. Mandelkow y E. M. Mandelkow (2010). «A $\beta$  oligomers cause localized Ca<sup>2+</sup> elevation, missorting of endogenous Tau into dendrites, Tau phosphorylation, and destruction of microtubules and spines». En: *J. Neurosci.* 30(36):11938-11950. DOI: [10.1523/JNEUROSCI.2357-10.2010](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2357-10.2010).
- Zhao, C., E. M. Teng, R. G. Summers Jr., G. L. Ming y F. H. Gage (2006). «Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus». En: *J. Neurosci.* 26(1):3-11. DOI: [10.1523/JNEUROSCI.3648-05.2006](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3648-05.2006).
- Zhao, Z., L. Ho, J. Suh, W. Qin, H. Pyo, P. Pompl, H. Ksiezak-Reding y G. M. Pasinetti (2003). «A role of P301L tau mutant in anti-apoptotic gene expression, cell cycle and apoptosis». En: *Mol. Cell. Neurosci.* 24(2):367-379. DOI: [10.1016/S1044-7431\(03\)00175-1](https://doi.org/10.1016/S1044-7431(03)00175-1).
- Zhou, Y., J. Shi, D. Chu, W. Hu, Z. Guan, C. X. Gong, K. Iqbal y F. Liu (2018). «Relevance of Phosphorylation and Truncation of Tau to the Etiopathogenesis of Alzheimer's Disease». En: *Front. Aging Neurosci.* 10(27). DOI: [10.3389/fnagi.2018.00027](https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00027).

*Yes, there are two paths you can go by  
But in the long run  
There's still time to change the road you're on*

Jimmy Page / Robert Plant